

Regulation des Kpp2/Kpp6-MAPK-Moduls in *Ustilago maydis* durch Phosphatasen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maurizio Di Stasio
aus Dierdorf

Marburg/Lahn 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann von Oktober 2005 bis Ende Januar 2009 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Di Stasio, M., Brefort, T., Mendoza-Mendoza, A., Münch, K. und Kahmann, R.
(2009) The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 73(1):73-88.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “*Regulation des Kpp2/Kpp6-MAPK Moduls in Ustilago maydis durch Phosphatasen*” selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Maurizio Di Stasio

*Die Wissenschaft ist die Asymptote der
Wahrheit, sie nähert ihr sich
unaufhörlich an und erreicht sie nie.*

Victor Hugo, *William Shakespeare*, Paris
1864

Meinen Eltern

ZUSAMMENFASSUNG

Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes, beginnt mit der Ausbildung von Konjugationshyphen und der anschließenden Fusion zweier haploider Sporidien. Die Infektion der Wirtspflanze erfolgt daraufhin nach Ausbildung des Dikaryons durch Appressorien. Diese Entwicklungsprozesse werden durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Während der bialellische *a*-Locus Zell-Zellerkennung und Zellfusion reguliert, werden die weiteren Entwicklungsschritte durch den multiallelischen *b*-Locus kontrolliert.

Die Regulation der Expression beider Loci sowie des morphologischen Wechsels erfolgt, neben einem cAMP-Signalweg, über ein konserviertes MAPK-Modul, bestehend aus der MAPKKK Kpp4, der MAPKK Fuz7 und den MAPK Kpp2 und Crk1. Die Aktivierung des MAPK-Moduls erfolgt, nach der Perzeption kompatiblen Pheromons durch anschließende hierarchische Phosphorylierung am konservierten TEY-Motiv. Während in anderen Organismen dual spezifische Protein-Tyrosin-Phosphatasen beschrieben wurden, welche die MAPK durch die Dephosphorylierung des TEY-Motivs negativ regulieren, waren solche Phosphatasen in *U. maydis* bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden mit Rok1 und Mkp2 zwei potentielle Msg5p-homologe dual spezifische Protein-Tyrosin-Phosphatasen identifiziert. *rok1* zeigt eine Pheromon-abhängig und *mkp2* eine cAMP-abhängig induzierte Expression. Während solopathogene *mkp2*-Deletionsstämme eine reduzierte Filamentation und eine leicht erniedrigte Virulenz zeigten führte die *rok1*-Deletion zu einem gegensätzlichen Phänotyp. *rok1*-Deletionsmutanten zeigen Filamentation, unabhängig von externen Stimuli und kompatiblen *b*-Loci sowie eine verstärkte transkriptionelle Pheromonantwort. Dementsprechend führt die Überexpression von *rok1* zur Inhibition der transkriptionellen und morphologischen Pheromonantwort und verhindert so die Paarung kompatibler Sporidien. Des Weiteren zeigen *rok1*-Deletionsmutanten eine drastisch erhöhte Virulenz, welche durch vermehrte Appressorienbildung und die effizientere Kolonisierung der Pflanze zu erklären ist. In Wildtyp-Stämmen wird eine effiziente Appressorienbildung nur durch die Kombination der beiden Stimuli „hydrophobe Oberfläche“ und „Fettsäure“ induziert, wohingegen für *rok1*-Deletionsstämme eine hydrophobe Oberfläche ausreicht die Appressorienbildung effizient, sogar über das Maß der maximalen Induktion im Wildtypstamm hinaus, zu induzieren. Somit reguliert Rok1 nicht nur die Pheromonantwort sondern auch die Induktion der Appressorienbildung. Epistasis-Analysen ordnen Rok1 unterhalb der MAPK-Kinase Fuz7 ein. Weiterhin ergaben phosphospezifische Westernanalysen, die Repression der Phosphorylierungsmagnitude der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 nach Pheromon-Stimulation durch *rok1*. Die Repression der MAPKs durch Rok1 spiegelt sich ebenfalls in der Suppression pathogenitätsassoziiierter Phänotypen beider MAPK-Einzeldelentionsmutanten durch Deletion von *rok1* wieder.

Somit ist es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen eine Protein-Phosphatase als negativen Regulator des Kpp2/Kpp6-MAPK-Moduls in *U. maydis* zu identifizieren und zu charakterisieren. Aufgrund der Eigenschaften der Phosphatase führt die Deletion von *rok1* zur genetischen Aktivierung des MAPK-Modul und bietet somit erstmals die Möglichkeit dessen Rolle auch während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* weiter zu untersuchen.

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

aa	Aminosäuren	PAA	Polyacrylamid
Amp	Ampicillin	PAGE	Polyacrylamid-
Ara	Arabinose	Gelelektrophorese	
bp	Basenpaar(e)	PC	Phenol/Chloroform
C-terminal	carboxyterminal	PCR	„polymerase chain reaction“
Cbx	Carboxin	PD	„potato dextrose“
CM	„complete medium“	PEG	Polyethylenglycol
c.p.m	„counts per minute“	Phleo	Phleomycin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethan-
DIC	„differential interference		sulphonat)
contrast“		PKA	„protein kinase A“
DMF	Dimethylformamid	PRE	„pheromone response element“
DMSO	Dimethylsulfoxid	PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
DSP	Protein-Tyrosin-Phosphatase	RT	„reverse transcription“ oder
	dualer Spezifität		Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
eGFP	„enhanced green fluorescent	TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
	protein“	TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-
ERK	„extracellular regulated kinase“		diamin
GFP	„green fluorescent protein“	Tris	Trishydroxymethylamino-
Glc	Glucose		methan
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
HMG	„high mobility group“	UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously
Hyg	Hygromycin		replicating sequence“
kb	Kilobasenpaar	UAS	„upstream activating sequence“
MAPK	„mitogen activated protein	Ü/N	über Nacht
	kinase“	Upm	Umdrehungen pro Minute
MAPKK	MAPK-Kinase	UV	ultraviolettes Licht
MKP	MAPK-Phosphatase	wt	Wildtyp
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-		
	sulphonat		
N-terminal	aminoterminal		sowie Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code
Nat	Nourseothricin		
NLS	„nuclear localization sequence“		
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm		
ORF	„open reading frame“		
MAPKKK	MAPKK-Kinase		
.			

Ein kleines s am Ende der Abkürzungen DSP, MAPK(K)(K) und PTP stellt den Plural dar

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus für pathogene Pilze.....	2
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyploci	5
1.4 Die Pheromonantwort in <i>U. maydis</i>	6
1.5 Signaltransduktion während der Zell-Zellerkennung und der pathogenen Entwicklung	7
1.6 Regulation von MAPK Aktivität.....	12
1.7 Regulation von MAPK durch DSPs in anderen pilzlichen Modellsystemen	13
1.8 Fragestellung dieser Arbeit	15
2 ERGEBNISSE	17
2.1 Potentielle Phosphatase-Regulatoren von Kpp2	17
2.2 Das <i>Ustilago maydis</i> Genom kodiert für acht putative MAPK-Phosphatasen der Protein-Tyrosin-Phosphatase Familie	17
2.3 Die Expression von <i>rok1</i> ist Pheromon-induziert	19
2.4 <i>rok1</i> inhibiert die Paarung kompatibler <i>U. maydis</i> Stämme.....	21
2.5 <i>rok1</i> spielt keine zentrale Rolle für die Stressregulation von <i>U. maydis</i>	23
2.6 <i>rok1</i> reguliert die morphologisch Pheromonantwort.....	25
2.7 <i>rok1</i> inhibiert die transkriptionelle Pheromonantwort	26
2.8 <i>rok1</i> reguliert den morphologischen Wechsel unterhalb von <i>fuz7</i>	27
2.9 cAMP inhibiert die Filamentation von Δ <i>rok1</i> -Stämmen	29
2.10 <i>rok1</i> beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 und Kpp6	30
2.11 Die Deletion von <i>rok1</i> kann Δ <i>kpp2</i> -Defekte in Paarungskompetenz und Konjugationshyphenbildung nicht supprimieren	32
2.12 Die Deletion von <i>rok1</i> suppressiert die Pathogenitätsdefekte von <i>kpp2</i> und <i>kpp6</i> Einzelmutanten partiell.....	33
2.13 <i>rok1</i> Deletionsmutanten zeigen eine drastisch erhöhte Virulenz	36
2.14 Die Deletion von <i>rok1</i> ersetzt die fehlende autokrine Pheromonstimulation in CL13.....	38
2.15 Die Deletion von <i>rok1</i> führt zu einer erhöhten <i>bE</i> -Expression in SG200 und CL13	39
2.16 Die Deletion von <i>rok1</i> führt nicht zur Pheromon-unabhängigen Zellfusion	40

2.17	<i>rok1</i> reguliert die Ausbildung von Infektionsstrukturen	42
2.18	Die Deletion von <i>rok1</i> führt zu einer erhöhten Kolonisierung des pflanzlichen Gewebes	43
2.19	<i>rok1</i> beeinflusst die Integration von Signalen, die zur Appressorienbildung führen	44
2.20	Die Lokalisation von Rok1 ändert sich nach Pheromonstimulation	46
2.21	Die Deletion des zweiten DSP-Gens, <i>mkp2</i> , führt zur Reduktion von Filamentation und Pathogenität	47
3 DISKUSSION		49
3.1	Rok 1 fällt in die Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität die pilzliche MAPK-Signalwege regulieren	50
3.2	<i>rok1</i> kontrolliert die Filamentation von <i>U. maydis</i> über die Balance zwischen aktivem cAMP- und aktivem MAPK-Signalweg.....	51
3.3	Rok1, ein zentraler negativer Regulator des Pheromon- und Pathogenitäts-MAPK-Moduls in <i>U. maydis</i>	53
3.4	Weitere Regulatoren der Pheromon-MAPK Kpp2 und Kpp6.....	57
3.5	Rok1 reguliert neben Filamentation auch die Appressorienbildung und die Kolonisierung der Wirtspflanze	59
3.6	Rok1 reguliert die Integration spezifischer Differenzierungssignale	61
3.7	Die dual spezifische Phosphatase, Mkp2, beeinflusst Filamentation und pathogene Entwicklung.....	62
4 MATERIAL UND METHODEN		64
4.1	Materialien und Bezugsquellen.....	64
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	64
4.1.2	Oligonukleotide	65
4.1.3	Stämme	68
4.1.4	Ausgangsplasmide	69
4.1.5	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	70
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	72
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	72
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i>	72
4.3	Molekularbiologische Standardmethoden	76
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	76
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	77
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	79
4.3.4	PCR-Techniken	79
4.4	Biochemische Methoden	81
4.4.1	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen.....	81
4.4.2	Transfer von Proteinen (Western-Blot).....	81
4.4.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	82
5 LITERATURVERZEICHNIS		83

1 EINLEITUNG

Der Erreger des Maisbeulenbrandes, *Ustilago maydis*, ist ein biotropher Pflanzenschädling, der ausschließlich *Zea mays* (Mais) und die ursprünglichere in Mittelamerika beheimatete nahe verwandte Art *Euchlena mexicana* (Teosinte) infiziert. Die Infektion mit *U. maydis* führt zur Bildung charakteristischer mit Teliosporen gefüllter Tumoren an allen oberirdischen Pflanzenteilen (Christensen, 1963). Die schwarzen Teliosporen verleihen befallenen Maispflanzen ein "verbranntes" Aussehen. So kamen die Namen Maisbeulenbrand und Brandpilz für die verursachten Symptome bzw. den pilzlichen Erreger zustande (lat. *ustilare* = verbrennen). *U. maydis* tritt in allen Regionen auf, in denen Mais angebaut wird. Als Pflanzenschädling spielt er in der Landwirtschaft jedoch ökonomisch nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr gelten die mit den schwarzen Teliosporen gefüllten Tumore in Mexico als Delikatesse und erzielen dort als „Huitlacoche“ (spanisch: Raben-Exkrement) oder auch als „Corn truffle“ (Maistrüffel) in den USA Preise von bis zu \$6/215g. Nichtsdestotrotz, gibt es vereinzelt Berichte über allergene Reaktionen oder Vergiftungen durch den übermäßigen Genuss der mit *U. maydis*-Sporen gefüllten Tumoren. So berichteten Mayerhofer und Dragisic (1938) von Vergiftungserscheinungen jugoslawischer Kinder nach dem Verzehr von mit Maisbeulenbrandsporen kontaminiertem Maisbrei. Jedoch genügten die Untersuchungen nicht den Koch'schen Postulaten zur Identifizierung von Krankheitserregern, sodass der ursächliche Zusammenhang von *U. maydis* Sporen und den Symptomen unklar blieb. Im Jahre 2005 wurde eine weitere Studie veröffentlicht nach der Infektion mit *U. maydis* zu Neurotoxizität sowie Organveränderungen in Ratten führten (Pepelnjak *et al.*, 2005). Dies wurde auf durch den Pilz produzierte Alkaloide zurückgeführt (Pepelnjak *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass der südostamerikanische Stamm der Zuni die Teliosporen dieses Pilzes ihren Frauen zur Einleitung der Geburt verabreichte (O'Dowd, 2001). Für diese Abort-hervorufende Wirkung werden ebenfalls vom Pilz produzierte Alkaloide, im Besonderen Ustilagin, verantwortlich gemacht (O'Dowd, 2001). Von diesen wenigen, teilweise zweifelhaften Ausnahmen abgesehen, scheint *U. maydis* jedoch keine medizinische Relevanz zu besitzen.

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus für pathogene Pilze

Trotz der eher geringen wirtschaftlichen und medizinischen Bedeutung, hat sich *U. maydis* in den letzten zwei Dekaden zu einem der bedeutendsten Modellorganismen für phytopathogene Pilze entwickelt (Basse und Steinberg, 2005). Dies liegt im kurzen Lebenszyklus von *U. maydis* sowie der einfachen Kultivierbarkeit sowohl des Pilzes als auch der Wirtspflanze Mais begründet. Die haploiden Basidiosporen (Sporidien) sind auf einfachen Nährmedien kultivierbar. Weiter sind sie einer Vielzahl von biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich. Durch die Entwicklung von frei-replizierenden und integrativen Plasmiden wurde es möglich, Komplementationsanalysen von Mutanten durchzuführen. Durch das effiziente homologe Rekombinationssystem über das *U. maydis* verfügt, sind gezielte Geninaktivierungen für revers-genetische Ansätze sowie die Konstruktion von Promotor- und Reportergenfusionen im nativen Locus möglich (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Das Vorliegen eines Kassettensystems aus frei kombinierbaren konstitutiven oder regulierbaren Promotoren, vier verschiedenen Resistenzmarkern, diversen Fluoreszenz Reportergenen und einer Vielzahl von 'tags' ermöglicht die detaillierte und effiziente funktionelle Charakterisierung von Genen (Spellig *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004; Kämper 2004). Durch die seit 2003 vorliegende Genomsequenz (Kämper *et al.*, 2006) ist es möglich, all diese Methoden zur gezielten Aktivierung, Inaktivierung und Manipulation von Genen ausgewählt anzuwenden. Die Entwicklung von Symptomen an allen oberirdischen Teilen der Maispflanze sowie der kurze Lebenszyklus von *U. maydis* ermöglicht zudem die detaillierte Analyse des Infektionsprozesses und machen *U. maydis* zu einem ausgezeichnetem Modellorganismus für phytopathogene Pilze.

1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Bei *U. maydis* ist die pathogene Entwicklung Voraussetzung für die Vollendung des sexuellen Lebenszyklus. Während dieses Zyklus liegt der Pilz in Bezug auf die Kernphasen in drei unterschiedlichen Stadien vor (Abbildung 1A): Die haploide Sporidie (1) ist apathogen und wächst saprophytisch durch Knospung. Die pathogene Form des Pilzes ist ein dikaryotisches Filament (2), das nach Fusion kompatibler Sporidien entsteht.

Nach der Ausbildung von Infektionsstrukturen (Appressorien) erfolgt die Penetration der Kutikula. Nach der Penetration kommt es in der Pflanze zunächst zu intrazellulärem Wachstum und später zu einer massiven Proliferation des Pilzes und der Bildung von Tumoren. In diesen Tumoren bilden sich die runden, diploiden Teliosporen (3), aus denen unter Durchlaufen der Meiose wieder die haploiden Sporidien auskeimen (4) (Abbildung 1 A und B).

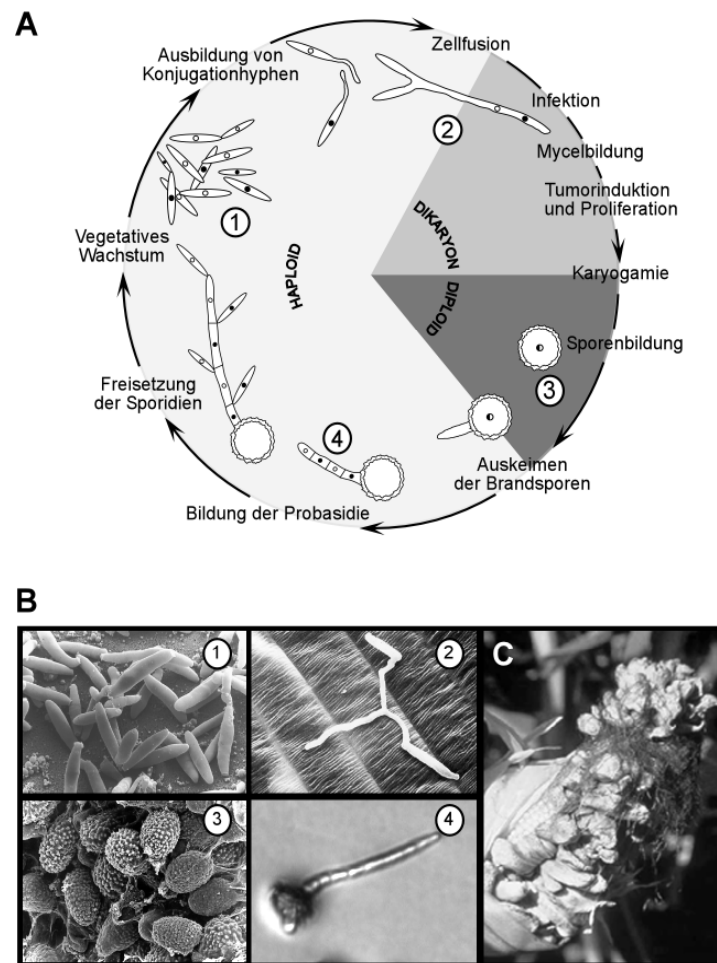


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus, Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die in (B) dargestellten Stadien;. (B) Rasterelektronen- und Lichtmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Knospung. (2) Fusion zweier haploider Zellen zum Dikaryon auf der Blattoberfläche. (3) Bildung der Brandsporen aus sporogenen Hyphen. (4) Keimung einer Brandspore unter Ausbildung der Probasidie. (C) Tumorbildung auf einem Maiskolben. Die Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger, J. Kämper (1, 3), K. Snetselaar (2) und S. Huber (4); vgl. Brefort, 2004.

Initiale Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion ist die gegenseitige Erkennung zweier kompatibler Sporidien (Abb. 1A und B). Kompatibilität ist gegeben, wenn sich die

Sporidien in dem biallelischen *a*- und dem multiallelischen *b*-Paarungstyplocus unterscheiden (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon – Pheromonrezeptorsystem (Bölker *et al.*, 1992). Die Perzeption von kompatibelem Pheromon induziert die Bildung von Konjugationshyphen, die gerichtet aufeinander zuwachsen und schließlich an ihren Spitzen fusionieren (Abb. 1A und B; Snetselaar, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Aus der Fusion geht das infektiöse, dikaryotische Filament hervor (Abb. 1B). Die Stabilisierung dieses dikaryotischen Filaments erfolgt durch den *b*-Locus (Banuett und Herskowitz, 1989). Die Stadien der Zellerkennung, Fusion und Dikaryenbildung können auch auf künstlichen Medien beobachtet werden. Die dikaryotischen Hyphen bilden in regelmäßigen Abständen in ihrem distalen Bereich leere Abschnitte, die auf aktivkohlehaltigen Agarplatten als weißes Luftmycel erkennbar sind. Dies lässt sich von den glatten, grauen Kolonien haploider Sporidien deutlich unterscheiden (Pulhalla, 1968; Rowell, 1955). Auf der Pflanzenoberfläche bildet das Dikaryon an geeigneter Stelle ein Appressorium aus (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Auch diese Differenzierung lässt sich *in vitro* induzieren, indem man *U. maydis* auf einer hydrophoben Oberfläche zusammen mit Hydroxyfettsäuren aufsprüht (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a). Alle weiteren Entwicklungsschritte erfolgen hingegen ausschließlich nach Interaktion mit der Pflanze. Die Penetration und das frühe intrazelluläre Wachstum des Dikaryons induzieren in der Pflanze die Bildung von Chlorosen und Anthocyan. Mit fortschreitender Infektion proliferieren die dikaryotischen Zellen im Apoplasten der Pflanze und etablieren ein dichtes Mycelgeflecht (Abb. 1A; Banuett und Herskowitz, 1994b). Damit einher geht die Induktion der Pflanzentumore etwa fünf Tage nach der Infektion. Diese Tumore können sich an allen oberirdischen Teilen der Pflanze bilden, sie bestehen sowohl aus Pflanzengewebe als auch aus Pilzmyzel (Abb. 1A und C; Christensen, 1963; Banuett und Herskowitz, 1994b). Nach Fragmentierung der dikaryotischen Filamente zu sporogenen Hyphen erfolgt die Karyogamie und schließlich die Differenzierung zu diploiden Teliosporen (Abb. 1B; Banuett und Herskowitz, 1996). Reife Tumore bestehen zum größten Teil aus den schwarz pigmentierten und von einer ornamentierten Sporenhülle geschützten Teliosporen (Abb. 1B und C). Nach Aufbrechen der reifen Tumore erfolgt die Verbreitung der Teliosporen durch Wind und Regen (Christensen, 1963). Bei günstigen Bedingungen keimen die Teliosporen unter Durchlaufen der Meiose und Abschnüren haploider Sporidien aus (Abb. 1A und B; Christensen, 1963). Die Vollendung des

Lebenszyklus erfordert also mehrere diskrete morphologische Differenzierungsprozesse (Banuett und Herskowitz, 2002; Kahmann *et al.*, 2000).

1.3 Kontrolle der sexuellen Entwicklung durch die Paarungstyploci

Der oben beschriebene Lebenszyklus wird in *U. maydis* durch zwei ungekoppelte Paarungstyploci, *a* und *b*, gesteuert. *U. maydis* durchläuft die sexuellen Entwicklungsschritte nur, wenn die Fusionspartner sich sowohl in ihren *a*- als auch in ihren *b*-Allelen unterscheiden

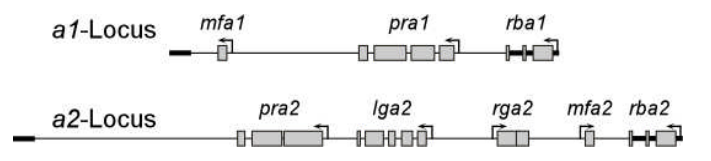


Abbildung 2: Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Pheromonrezeptorsystem. Schematische Darstellung des *a1*- und des *a2*-Locus. Auf der rechten Seite sind zusätzlich die außerhalb der *a*-Loci liegenden Gene *rba1* bzw. *rba2* angedeutet. Der *a1*- und der *a2*-Locus sind von homologen DNA-Flanken begrenzt (dicke Linie), die Rechtecke stehen für kodierende Bereiche; vgl. Müller, 2003 und Brefort, 2004.

a-Locus nur in zwei Allelen,

a1 und *a2*, vor (Kahmann *et al.*, 1995; Rowell und DeVay, 1954). Der *a*-Locus kontrolliert die Zell-Zellerkennung und die anschließende Fusion der Sporidien. Die postfunktionalen Prozesse und die pathogene Entwicklung werden durch den *b*-Locus gesteuert (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1961; Pulhalla, 1968).

In Übereinstimmung mit seiner Funktion bei der Zellfusion kodiert der *a*-Locus für die Komponenten eines Pheromon-Pheromonrezeptorsystems, welches die wechselseitige Erkennung zwischen *a1*- und *a2*-Sporidien erlaubt. Beide *a*-Loci tragen die Gene für je eines der beiden Pheromonpräpeptide Mfa (*mating factor a*) und je einen Pheromonrezeptor Pra (*pheromone receptor a*) (Abb. 2; Bölker *et al.*, 1992). Die gegenseitige Erkennung kompatibler Sporidien wird durch die unterschiedliche Spezifität der Pheromone und ihrer Rezeptoren gewährleistet. Nur das *a2*-kodierte Pheromon Mfa2 ist in der Lage an den von kompatiblen *a1*-Sporidien exprimierten Pheromonrezeptor Pra1 zu binden, während das *a1*-kodierte Pheromon Mfa1 den Pra2-Rezeptor bindet.

Der *b*-Locus trägt zwei divergent transkribierte Gene *bE* (*bEast*) und *bW* (*bWest*) (Abb. 3; Gillissen *et al.*, 1992), die für je eine Untereinheit eines Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren. Ein aktiver Transkriptionsfaktor entsteht erst durch die Heterodimerisierung von bE- und bW-Proteinen. Diese erfolgt jedoch ausschließlich, wenn bE und bW von verschiedenen Allelen stammen (Abb. 3; Kämper *et al.*, 1995). Durch das

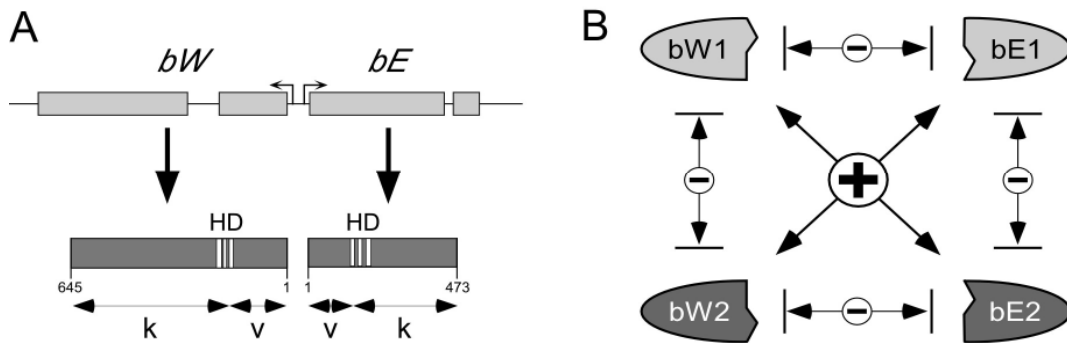


Abbildung 3: (A) Der *b*-Locus kodiert für zwei Homeodomänen-Proteine *bW* und *bE*. In der schematischen Darstellung stehen die Rechtecke für kodierende Bereiche. Die Homeodomänen in *bW* und *bE* sind mit HD gekennzeichnet. Die Konstanten Regionen sind durch ein k, die variablen Bereiche durch v gekennzeichnet. Die Länge der Proteine ist in Aminosäuren angegeben. **(B) Allel-spezifische Dimerisierung der *b*-Proteine.** *bW*- und *bE*-Proteine dimerisieren nur dann miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen; vgl. Brachman 2003.

aktive Heterodimer wird die Expression einer Vielzahl von Genen direkt und indirekt reguliert (Brachmann *et al.*, 2003; Romeis *et al.*, 2000; M. Scherer und J. Kämper, pers. Mitteilung). Das aktive bE/bW-Heterodimer ist für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* notwendig und hinreichend. Diese Erkenntnisse ermöglichten die Herstellung solopathogener Stämme, in denen der *b*-Locus haploider Stämme so modifiziert wurde, dass er für ein aktives bE1/bW2-Heterodimer kodiert (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

1.4 Die Pheromonantwort in *U. maydis*

Die initialen Schritte der sexuellen Entwicklung, die Erkennung und Fusion kompatibler Zellen, werden durch die Perzeption des Pheromonsignals eingeleitet. Die damit

einhergehenden morphologischen und transkriptionellen Veränderungen werden zusammenfassend als Pheromonantwort bezeichnet.

Der morphologische Zweig der Pheromonantwort besteht in der Bildung von Konjugationshyphen, die auf die Pheromonquelle zuwachsenden. Einhergehend wechselt die Zelle von ihrem bipolaren Knospungsmuster zum monopolaren, filamentösen Wachstum der Konjugationshyphen (Snetselaar *et al.*, 1996). Dies erfolgt nach dem Zellzyklusarrest in der postreplikativen G₂-Phase, der durch das Pheromonsignal induziert wird (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Aus der Fusion der Konjugationshyphen zweier kompatibler Sporidien entsteht das filamentöse Dikaryon (Banuett und Herskowitz, 1994b). Die Aufrechterhaltung dieses infektiösen Filaments wird durch die autokrine Pheromonstimulation und ein aktives b-Heterodimer gewährleistet (Banuett und Herskowitz, 1989).

Neben dem morphologischen Wechsel wird durch die Perzeption von kompatiblen Pheromon eine transkriptionelle Antwort induziert. Diese umfasst die Pheromon-induzierte Expression der Gene im *a*- und *b*-Locus (Urban *et al.*, 1996b) sowie die Aktivierung bzw. Repression einer großen Zahl weiterer Gene (Eichhorn, 2004, Zarnack *et al.*, 2008). Die induzierte Expression des *mfa*-Gens bewirkt eine gesteigerte Sekretion des Pheromons, wodurch der Kreuzungspartner verstärkt stimuliert wird. Die gleichzeitig erhöhte Expression des Pheromonrezeptors *Pra* amplifiziert die Perzeption des Pheromonsignals zusätzlich. Durch diese positive Rückkopplung wird vermutlich das gerichtete aufeinander Zuwachsen der Konjugationshyphen über größere Distanzen ermöglicht (Snetselaar *et al.*, 1996). Die Pheromon-induzierte Transkription der *b*-Gene gewährleistet zudem bereits vor der Zellfusion ausreichende Mengen an b-Protein (Urban *et al.*, 1996b), so dass sich unmittelbar nach der Fusion die zur Etablierung des infektiösen Dikaryons benötigten, aktiven bE/bW-Heterodimere bilden können (Urban *et al.*, 1996b).

1.5 Signaltransduktion während der Zell-Zellerkennung und der pathogenen Entwicklung

Die Perzeption von kompatibelem Pheromon führt zur Aktivierung der cAMP-Signalkaskade (*cyclic adenosine monophosphate*) und von einem MAPK-Modul (*mitogen-activated-protein kinase*).

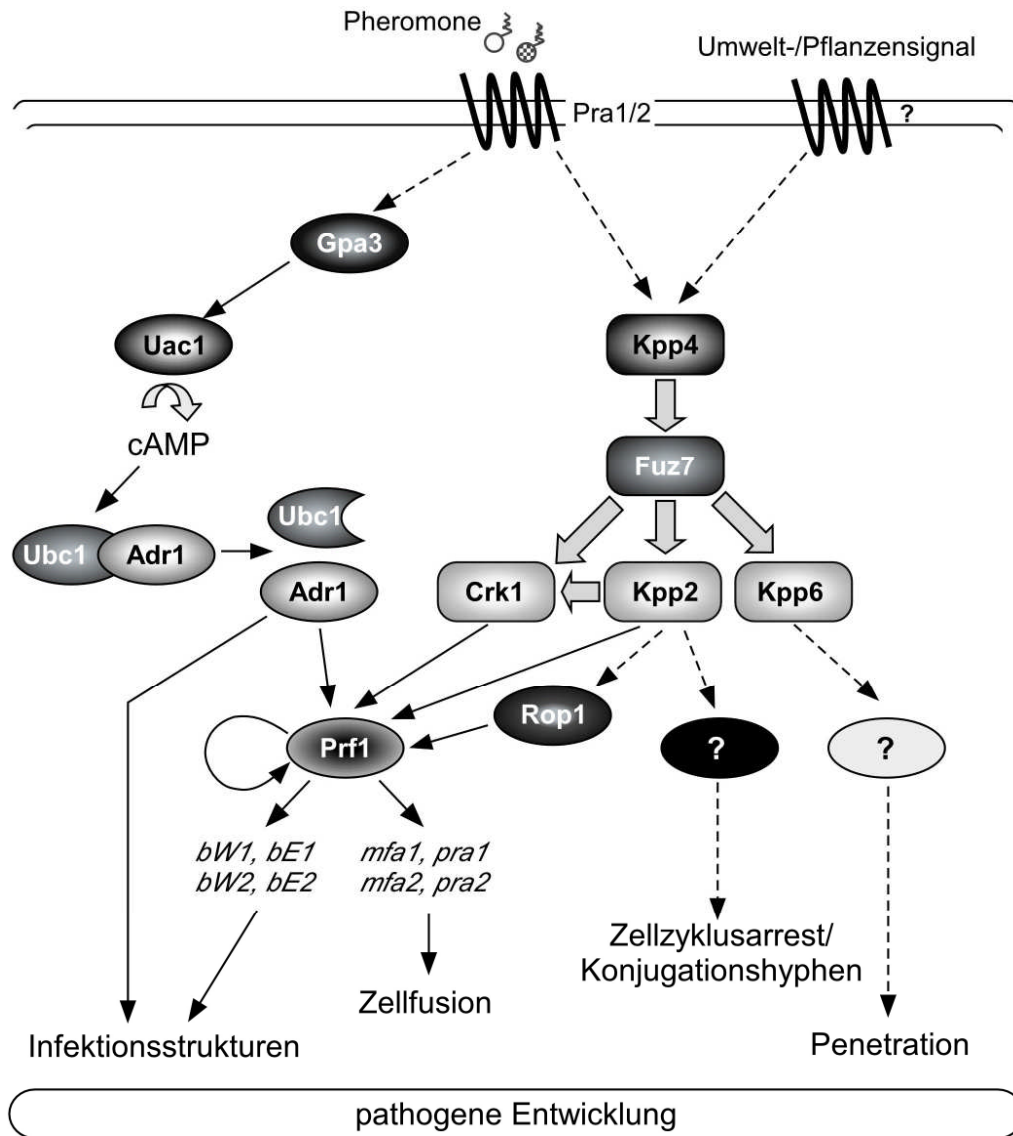


Abbildung 4: Signalweiterleitung während der Pheromonantwort und der pathogenen Entwicklung. Die Pheromonstimulation führt zu einer Aktivierung von Prf1. Prf1 induziert die Expression der *a*- und *b*-Locus Gene sowie, autoregulatorisch, die des *prf1*-Gens. Die α -Untereinheit Gpa3 und der cAMP-Signalweg sind an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt (siehe Text). Das Kpp2-MAPK-Modul aktiviert das Prf1-Protein direkt und über Regulatoren der Transkription von *prf1* (Crk1 und Rop1). Außerdem induziert das MAPK-Modul Konjugationshyphenbildung. Demnach könnten ein oder mehrere weitere Transkriptionsfaktoren existieren, die die Konjugationshyphenbildung kontrollieren. Die MAPK Kpp2 vermittelt dabei über Prf1 die Expression aktiver b-Heterodimere. Zusätzlich ist Kpp2 für die Ausbildung von Infektionsstrukturen erforderlich. Die MAPK Kpp6 ist an der Regulation der Penetration der Pflanzenoberfläche beteiligt. Unabhängig davon ist auch der cAMP-Signalweg für die pathogene Entwicklung notwendig. Pfeile stehen für aktivierende Einflüsse, wie Phosphorylierung und transkriptionelle Induktionen. Gestrichelte Pfeile stellen postulierte bzw. über bisher unbekannte Komponenten erfolgende Interaktionen dar.

Im cAMP-Signalweg erfolgt die Weiterleitung über die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins Gpa3 (Müller *et al.*, 2003a; Regenfelder *et al.*, 1997), die Adenylatzyklase Uac1 und eine cAMP-aktivierte Proteinkinase A (PKA), die sich aus der regulatorischen (Ubc1) und der katalytischen Untereinheit Adr1 zusammensetzt (Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). Die Adenylatzyklase Uac1 katalysiert nach Aktivierung durch Gpa3 die Umsetzung von ATP zu cAMP. Hierdurch steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel. cAMP bindet daraufhin an die regulatorische Untereinheit Ubc1 der PKA. Dies hat die Freisetzung und damit Aktivierung der katalytischen Untereinheit Adr1 zur Folge (Abb. 4). Aktivierende Signale und Signaltransduktionskomponenten oberhalb von Gpa3 sind allerdings bisher nicht bekannt. Jedoch ist die transiente Aktivierung der cAMP-Signalkaskade entscheidend an der Pheromonantwort beteiligt (Abb. 4). So führen die Deletionen von *gpa3*, *uac1* oder *adr1* zu Defekten in der Pheromon-induzierten *a*-Genexpression und zur Reduktion der Paarungskompetenz (Müller *et al.*, 2003b; Regenfelder *et al.*, 1997, Dürrenberger *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1994). Hingegen führt die Aktivierung der Kaskade durch die Zugabe von exogenem cAMP, die Expression des dominant aktiven *gpa3*^{Q206L}-Allels oder die Deletion der regulatorischen Untereinheit Ubc1 der Proteinkinase A zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Prf1 und hierüber eine starken Induktion der Pheromongenexpression (Hartmann *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Die Aktivierung der PKA löst jedoch keine Konjugationshyphenbildung aus, sie reprimiert vielmehr den morphologischen Wechsel zur Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation (Müller, 2003). Desweiteren hat die Deletion von *gpa3*, wodurch eine Weiterleitung des Pheromonsignals über den cAMP-Signalweg verhindert wird, in Anwesenheit von cAMP keine negativen Auswirkung auf die Konjugationshyphenbildung (Müller, 2003). Der cAMP-Signalweg ist also für die transkriptionelle Pheromonantwort essentiell, reprimiert jedoch den morphologischen Wechsel zu Konjugationshyphen.

Neben dem cAMP-Signalweg ist ein konserviertes MAPK-Modul für die Weiterleitung des Pheromonsignals entscheidend (Abb. 4). In einem genetischen Ansatz zur Identifizierung von Suppressoren des durch den Verlust des Adenylatzyklasegens *uac1* hervorgerufenen filamentösen Phänotyps wurden viele Komponenten des MAPK-Moduls gefunden (Kpp4/Ubc4; Fuz7/Ubc5 und Kpp2/Ubc3) (Mayorga und Gold, 1999; Andrews *et al.*, 2000). Dies zeigt die antagonistische Wirkung von cAMP-Signalweg und des

MAPK-Modul. Im Bezug auf die morphologische Pheromonantwort sind alle drei Komponenten des MAPK-Moduls essentiell (Müller *et al.*, 1999 und 2003b). Weitere Komponenten dieses Moduls sind die MAPKs Crk1 und Kpp6. Auch diese MAPKs werden durch die MAPKK Fuz7 phosphoryliert (Garrido *et al.*, 2004; Di Stasio *et al.*, 2009). Das MAPK-Modul agiert unterhalb des Pheromonrezeptors Pra, wobei auch hier die Komponenten der Signalweiterleitung zwischen Rezeptor und MAPKKK nicht bekannt sind (Abb. 4; Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999 und 2003b; Garrido *et al.*, 2004). Nach Perzeption des kompatiblen Pheromonsignals erfolgt die Phosphorylierung MAPKK Fuz7 durch die MAPKKK Kpp4 (Müller *et al.*, 2003b). Die aktive MAPKK Fuz7 wiederum phosphoryliert die drei MAPK des Moduls Kpp2, Crk1 und Kpp6 (Abb. 4; Müller *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2004; Di Stasio *et al.*, 2009). Während Kpp6 nicht an der Pheromonantwort beteiligt ist (Brachmann *et al.*, 2003), regulieren die anderen MAPK des Moduls, Crk1 und Kpp2, die transkriptionelle und morphologische Antwort auf ein Pheromonsignal und sind für die Paarung kompatibler Stämme essentiell (Müller *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2004). Alle drei MAPK werden durch die MAPKK Fuz7 an der Phosphatakzeptorstelle (TEY-Motiv) im „T-Loop“ phosphoryliert (Müller *et al.*, 2003b; Brachmann *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2004). Crk1 besitzt neben TEY-Motiv im N-terminalen Bereich zwei MAPK-Phosphorylierungsstellen der Konsensussequenz L/PXS/TP (Clark-Lewis *et al.*, 1991; Garrido *et al.*, 2004). Während für die transkriptionelle Pheromonantwort nur die Phosphorylierung durch Fuz7 essentiell zu sein scheint, wird die zusätzliche Phosphorylierung (wahrscheinlich durch Kpp2) an den MAPK-Phosphorylierungsstellen für die Induktion filamentösen Wachstums durch Crk1 benötigt (Garrido *et al.*, 2004). Sowohl die Kinaseaktivität als auch eine intakte Phosphatakzeptorstelle (TEY-Motiv) von Kpp2 sind für die Differenzierung zu Konjugationshyphen essentiell (Müller *et al.*, 2003b). Die transkriptionelle Pheromonantwort benötigt hingegen nur ein intaktes TEY-Motiv und ist unabhängig von der Kinaseaktivität der MAPK (Müller *et al.*, 2003b).

Es ist gelungen konstitutiv aktive Versionen der MAPKK-Kinase Kpp4 (Kpp4PS) und der MAPK-Kinase Fuz7 (Fuz7DD) zu generieren (Müller *et al.*, 2003b). Die Expression der konstitutiv aktiven Versionen führt zur Phosphorylierung von Kpp2 und hieraus resultierend zur transkriptionellen Aktivierung der Paarungstypgene und zur Ausbildung von Konjugationshyphen (Abb. 4; Müller *et al.*, 2003b). Die Expression von Fuz7DD führt bei gleichzeitiger, konstitutiver Expression der jeweiligen MAPK auch zur Phosphorylierung von Crk1 und Kpp6 (Garrido *et al.*, 2004; Di Stasio *et al.*, 2009).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Signalwege, der cAMP und der MAPK-Signalweg, zur transkriptionellen Aktivierung der *a*- und *b*-Gene führen. Die transkriptionelle Pheromonantwort wird zum größten Teil durch den zentralen Transkriptionsfaktor Prf1 reguliert. Dieses HMG-Domänen Protein ist für die basale und Pheromon-induzierte Transkription der *a*- und *b*-Gene essenziell (Abb. 2; Hartmann *et al.*, 1996). Die Deletion von *prf1* führt deshalb zum Verlust der *a*-Genexpression und die Zellen sind durch das Fehlen des Pheromonrezeptors Pra nicht in der Lage das Pheromonsignal wahrzunehmen (Hartmann *et al.*, 1996). Die Transkription von *prf1* unterliegt einer komplexen Kontrolle durch das Pheromonsignal und Umweltfaktoren (Hartmann *et al.*, 1999). So führt die Deletion von *rop1* (*regulator of prf*) oder *hap2* zum Verlust der basalen und Pheromon-induzierten Expression von *prf1* in axenischer Kultur (Brefort *et al.*, 2005; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Zusätzlich wird die Aktivität des Prf1-Proteins über Phosphorylierungen an PKA- und MAPK-Phosphorylierungsstellen durch die beiden oben beschriebenen Signaltransduktionswege reguliert (Abb. 4; Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Obwohl Prf1 als zentraler Regulator der transkriptionellen Pheromonantwort für die sexuelle Entwicklung absolut erforderlich ist, wird *prf1* für die Konjugationshyphenbildung, nicht benötigt, wenn die Expression des Pheromonrezeptors Pra von der Aktivierung durch Prf1 entkoppelt wird (Müller *et al.*, 2003).

Auf der Pflanze scheint die Expression von *prf1*, neben der Regulation durch Pheromon, weiteren Faktoren zu unterliegen. Die zentralen Regulatoren der *prf1*-Expression in axenischer Kultur scheinen für die pathogene Entwicklung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während die Deletion von *hap2* zu einer reduzierten Pathogenität von *U. maydis* führt sind *rop1*-Deletionsstämme voll pathogen (Brefort *et al.*, 2005; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Es wurde postuliert, dass auf der Pflanzenoberfläche weitere, möglicherweise von der Pflanze bereitgestellte Signale, die *prf1*-Expression regulieren (Brefort *et al.*, 2005). Ein solcher Stimulus könnten Fettsäuren wie 16-Hydroxy-Hexadekansäure sein, die die *mfa*-Gen-Expression in *U. maydis* induziert (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009).

Während *kpp4*- als auch *fuz7*-Deletionsmutanten einen Verlust der Dikaryenbildung und Pathogenität zeigen (Banuett und Herskowitz, 1994a; Andrews *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003) führt die Deletion von *kpp2*, *kpp6* oder *crk1* nur zu einer Attenuation der Pathogenität (Müller *et al.*, 1999 und 2003; Mayorga und Gold, 1999). Dies kann durch die teilweise redundanten Funktionen der MAPK Kpp2 und Kpp6 während der Ausbildung der

Infektionsstrukturen erklärt werden (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003). Neben redundanten Funktionen zur MAPK Kpp2 während der pathogenen Entwicklung konnten der MAPK Kpp6 auch spezifische Aufgaben während des Infektionsprozesses zugeordnet werden. So ist die Aktivierung der MAPK Kpp6 am TEY-Motiv essentiell für die Penetration der Pflanzenkutikula nach Ausbildung der Appressorien-ähnlichen Infektionsstrukturen (Brachmann *et al.*, 2003).

1.6 Regulation von MAPK Aktivität

Die Kernbestandteile aller eukaryotischer MAPK-Module sind hoch konserviert. Diese Module bestehen jeweils aus drei hierarchisch agierenden Hauptkomponenten, der MAPKK-Kinase (MAPKKK), der MAPK-Kinase (MAPKK) und der MAP-Kinase (MAPK) (Abb. 4; Chen *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001). Das zu übermittelnde Signal wird dabei mittels Phosphorylierung zweier konservierter Serin- und/oder Threonin-Aminosäurereste von der MAPKKK auf die MAPKK übertragen. Die so aktivierte dual-spezifische MAPKK phosphoryliert daraufhin den Threonin- und den Tyrosin-Aminosäurerest des TXY-Motivs im „T-Loop“ der MAPK. Die aktivierten MAPKs phosphorylieren daraufhin den Serin- bzw. Threonin-Aminosäurerest im Konsensusmotivs L/PxS/TP ihrer spezifischen Effektorproteine (Clark-Lewis *et al.*, 1991). Arbeiten aus den letzten Jahren haben gezeigt, dass der Grad und die Dauer der Aktivierung von MAPK die Spezifität von Signalwegen entscheidend kontrollieren (Pouyssegur und Lenormand, 2003; Ebisuya *et al.*, 2005; Murphy und Blenis, 2006).

Neben der aktivierenden Phosphorylierung durch MAPKKs wird die Aktivität der MAPK durch Dephosphorylierung des TXY- Motiv durch MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP) reguliert. MKPs lassen sich in drei Klassen einordnen, die ihre Spezifität für die Dephosphorylierung des Serin/Threonin- oder des Tyrosin-Aminosäurerestes des TXY-Motivs widerspiegeln: 1. Protein-Serin-/Threonin- Phosphatasen, die die MAPK-Aktivität über die Dephosphorylierung des Threonins regulieren; 2. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP), die den Tyrosin-Aminosäurerest dephosphorylieren und 3. Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität (DSP) die sowohl Tyrosin- als auch Threoninreste des TXY-Motivs von MAPK dephosphorylieren. Phosphatasen der letzten beiden Kategorien, zeichnen sich durch identische Konsensussequenzen HC[X]₅R in ihrer katalytischen

Proteindomäne aus. DSPs besitzen allerdings eine größere Phosphatbindetasche als PTPs, was zusätzlich das Binden und Dephosphorylieren von den im Vergleich zu Phospho-Serin/Threonin- größeren Phospho-Tyrosinresten erlaubt (Denu *et al.*, 1996; Denu und Dixon, 1998).

1.7 Regulation von MAPK durch DSPs in anderen pilzlichen Modellsystemen

MAPK-Phosphatasen, insbesondere die Klasse der PTP und DSP, spielen in der Regulation von MAPK-Modulen anderer pilzlicher Modellsysteme eine entscheidende Rolle. So wird in *Schizosaccharomyces pombe* der Phosphorylierungsstatus der MAPK Pmk1 von der DSP Pmp1 kontrolliert (Abb. 5A; Sugiura *et al.*, 2003). Das Pmk1-MAPK-Modul in *S. pombe* reguliert Zytokinese, Zellintegrität und Chloridionen-Homeostase

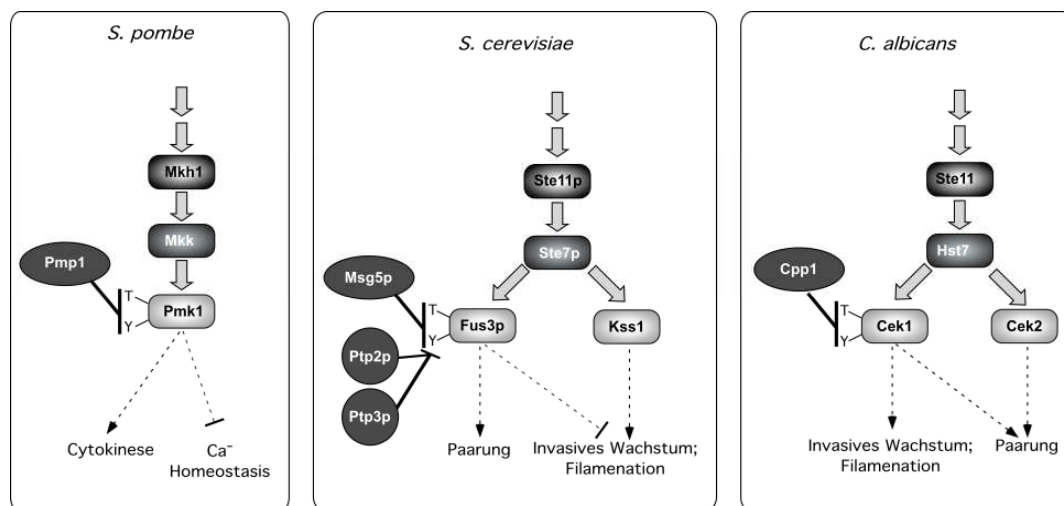


Abbildung 5: MAPK Regulation in anderen pilzlichen Modellsystemen. Dargestellt sind die Hauptkomponenten der MAPK-Module aus *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*. Die dargestellten Phosphatasen (dunkelgrau hinterlegt) sind in zwei zu unterteilt: Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Kreise) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität (DSP; Elipse). Dicke, graue Pfeile stellen Phosphorylierung da, gestrichelte, dünne Pfeile transkriptionelle Induktion. Dephosphorylierung von Threonin (T) oder Tyrosin (Y) ist durch einen mit einem Balken enden Strich gekennzeichnet. Beschriftete Pfeile (unten) symbolisieren die durch die jeweiligen MAP-Kinase regulierte physiologische Reaktion.

(Abb. 5A; Sugiura *et al.*, 1998). Eine weitere Studie zeigte, dass Pmp1 zusätzlich die Regulation der Pheromonantwort steuert (Didmon *et al.*, 2002). In besagter Studie konnte zwar kein direkter Einfluss von Pmp1 auf die Pheromon-MAPK Spk2 gezeigt werden, die

Deletion von *pmp1* führte jedoch zu einer erhöhten Expression von Zielgenen der Pheromonantwort (Didmon *et al.*, 2002). Auch in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*, in dem erst um die Jahrtausendwende ein sexueller Zyklus nachgewiesen wurde (Hull *et al.*, 2000; Hull und Johnson, 1999; Magee und Magee, 2000), spielen DSPs eine entscheidende Rolle in der Regulation von MAPK-Modulen. Näher untersucht ist hier die Funktion der DSP Cpp1, die die Phosphorylierung und Aktivität der MAPK Cek1 kontrolliert (Abbildung 5A; Csank *et al.*, 1997). Cek1 ist zusammen mit der eng verwandten und funktionell redundanten MAPK Cek2 für die Zellfusion erforderlich (Abb. 5A; Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002). Diese beiden MAPKs regulieren gemeinsam die Pheromonantwort in *C. albicans*.

Eines der bestuntersuchten Systeme für MAPK-Signalwege und deren Regulation durch Phosphatasen ist jedoch *Saccharomyces cerevisiae*. Msg5p in *S. cerevisiae* war eine der

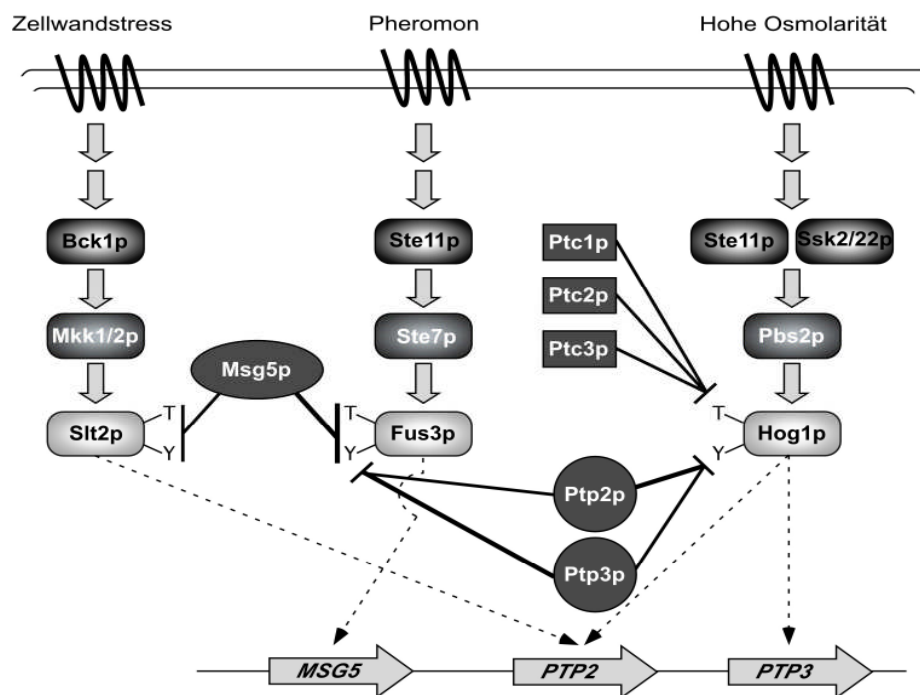


Abbildung 6: Regulation von MAPK-Signalwegen durch Protein-Phosphatasen in *Saccharomyces cerevisiae*. Dargestellt sind die Hauptkomponenten der MAPK-Module für Zellwandintegrität, Pheromonantwort und Osmostress. Die dargestellten Phosphatasen (dunkelgrau hinterlegt) sind in drei Klassen zu unterteilen: Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (Rechtecke), Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Kreise) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität (DSP; Elipse). Dicke, graue Pfeile stellen Phosphorylierung da, gestrichelte, dünne Pfeile transkriptionelle Induktion. Dephosphorylierung von Threonin (T) oder Tyrosin (Y) ist durch einen mit einem Balken endenden Strich gekennzeichnet. Beschriftete Pfeile (unten) symbolisieren Gene.

ersten identifizierten DSPs in Pilzen. Diese DSP kontrolliert die Adaptation der Pheromonantwort durch Regulierung des Phosphorylierungsstatus der Fus3p-MAP-Kinase

(Abb. 5A und B; Doi *et al.*, 1994). Darüberhinaus reguliert Msg5p die MAPK des Zellintegritäts-Signalweges Slt2p, einer weiteren MAPK der sogenannten ERK1/2-MAPK Familie (Abb. 5B; Martín *et al.*, 2000; Flández *et al.*, 2004). Die Aktivität von Fus3p wird neben Msg5p zusätzlich von den PTP Ptp2p und Ptp3p gesteuert (Abb. 5B; Zahn *et al.*, 1997). Abgesehen von dem Fus3p-Pheromon-MAPK-Signalweg wird auch der Hog1p-Signalweg durch Ptp2p und Ptp3p reguliert. Dieser Signalweg ist für das Wachstum unter hypertonischen Bedingungen essentiell. Zusätzlich beeinflusst Ptp2p den Aktivierungszustand von Slt2p (Abb. 5B; Martín *et al.*, 2005 und darin enthaltene Referenzen). Damit stellen MKP entscheidende Modulatoren der Aktivität einer oder mehrerer MAPK-Module dar und gewährleistet die Spezifität der zellulären Reaktionen auf verschiedene Signale.

Die Regulation der MKP Aktivität in *S. cerevisiae*, scheint in den meisten Fällen über die Gen-Expression der jeweiligen MKP-Gene zu geschehen. So ist die Expression dieser negativen Regulatoren transkriptionell durch die selben Stimuli induziert durch die auch das entsprechende MAPK-Substrat aktiviert wird (Abb. 5B; Alessi *et al.*, 1993; Doi *et al.*, 1994). In vielen Fällen wird die Induktion der MKP-Genexpression sogar von der entsprechenden MAPK abhängig (Abb. 5B; Martín *et al.*, 2005 und darin enthaltene Referenzen). Auch in der Spaltheife *S. pombe* wird die Expression der MKP Sty2 durch die Aktivität der MAPKK Wis1 reguliert und führt somit zu einer negativen Rückkopplung (Abb. 5A; Millar *et al.*, 1995). MKP sind also Komponenten negativer Rückkopplung. Dieser Mechanismus gewährleistet die Adaptation an Stimuli durch eine transiente Aktivierung der MAPK.

1.8 Fragestellung dieser Arbeit

Die MAPK Kpp2 ist der zentrale Regulator der transkriptionellen und morphologischen Pheromonantwort und essentiell für die Initiation der pathogenen Entwicklung in *U. maydis*. Aufgrund dieser essentiellen Funktion von Kpp2 liefern Untersuchungen der Regulation dieser MAPK fundamentale Einblicke in die Kontrolle pathogener Entwicklung. Während die aktivierenden Komponenten und Schritte für die transkriptionelle und morphologische Pheromonantwort und Appressorienbildung durch das MAPK-Modul weitgehend bekannt sind, ist bisher unklar wie die aktivierte MAPK in

den inaktiven Status zurückgeführt wird um eine konstitutive Aktivierung des Pheromon-MAPK-Moduls zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der posttranslationalen Regulation von Kpp2 durch Phosphatasen geklärt werden. Ein besonderes Interesse galt dabei den Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität. Es sollte untersucht werden, welche MAP-Kinase-Phosphatase die entscheidende Kontrolle der MAPK-Aktivität übernimmt.

2 ERGEBNISSE

2.1 Potentielle Phosphatase-Regulatoren von Kpp2

Die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) Kpp2 ist der zentrale Regulator der Pheromonantwort von *Ustilago maydis*. Sie reguliert sowohl die Pheromon induzierte Genexpression als auch den morphologischen Wechsel nach Perzeption eines kompatiblen Pheromonsignals (Müller *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2003). Wie in der Einleitung näher beschrieben, werden die zentralen MAPK der Pheromonantwort in *C. albicans* und *S. cerevisiae* durch sogenannte MAPK-Phosphatasen negativ reguliert. In beiden Organismen spielen dabei Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTP) die wichtigste Rolle. Um nähere Erkenntnisse zur Regulation der Pheromonantwort in *U. maydis* zu erlangen, wurden Msg5p-ähnliche PTPs in *U. maydis* identifiziert und auf ihre Beteiligung an der Pheromonantwort und der pathogenen Entwicklung hin untersucht.

2.2 Das *Ustilago maydis* Genom kodiert für acht putative MAPK-Phosphatasen der Protein-Tyrosin-Phosphatase Familie

Zur Identifizierung von potentiellen MAPK-Phosphatasen der Pheromonantwort in *U. maydis* wurden die jeweiligen hoch konservierte Protein-Tyrosin-Phosphatase Domänen bekannter Vertreter dieser Regulatoren in einer BLAST-gestützten Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) benutzt. So wurden insgesamt acht potentielle Protein-Tyrosin-Phosphatasen identifiziert und anschließend zur Klassifizierung zusammen mit bereits beschriebenen PTPs anderer Pilzspezies einer phylogenetischen Analyse nach dem 'Bootstrap'-Verfahren (Thompson *et al.*, 1997) unterzogen (Abb. 7). Protein-Tyrosin-Phosphatasen können in reine Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität (DSP) unterteilt werden (Abb. 7A). Diese vergleichende Analyse erlaubte die Zuordnung der identifizierten Phosphatasen in die Klasse der PTPs und der DSPs. Die zentralen

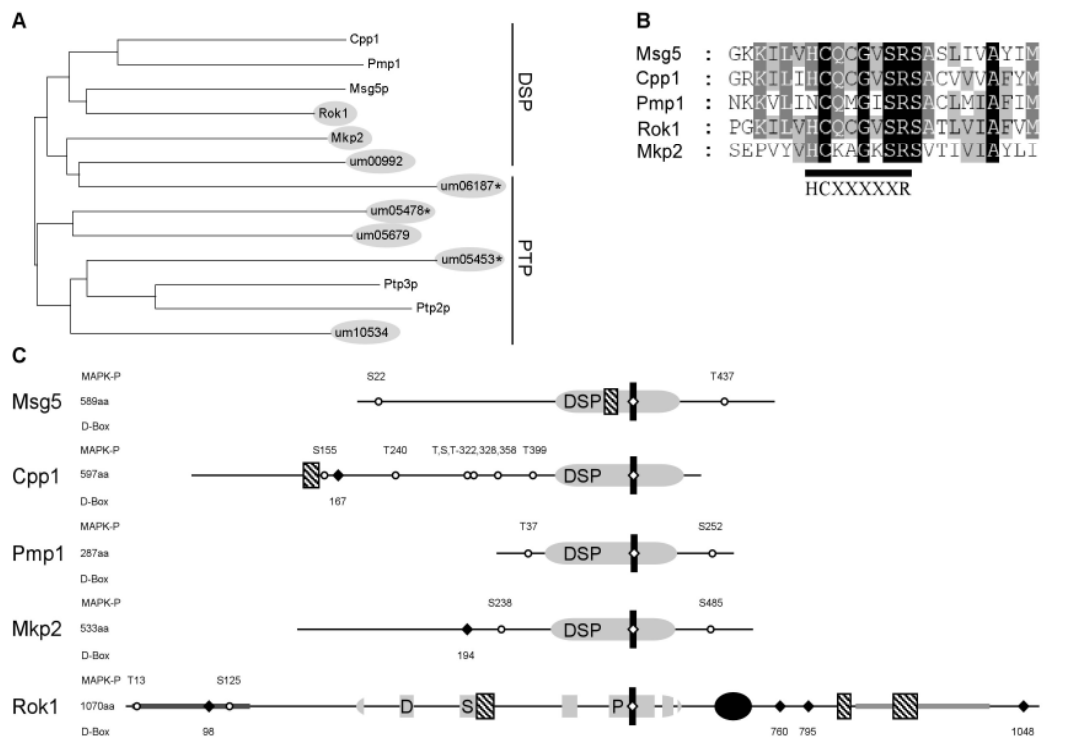


Abbildung 7: Das *U. maydis* Genom kodiert für acht putative MAPK-Phosphatasen. (A) Ein phylogenetischer Vergleich der acht identifizierten putativen *U. maydis* Protein-Tyrosin Phosphatasen (grau hinterlegt) mit, an Paarung und Morphogenese beteiligten Protein-Tyrosin Phosphatasen aus *S. cerevisiae* (Msg5p, Ptp2p, Ptp3p), *S. pombe* (Pmp1) und *C. albicans* (Cpp1). Protein-Tyrosin Phosphatasen können, wie angegeben in reine Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTP) und Protein-Tyrosin Phosphatasen dualer Spezifität unterteilt werden (DSP). Ein Stern (*) markiert PTP bei denen aufgrund der Sequenz nicht zwischen reinen PTP und DSP unterschieden werden kann. Die Analyse wurde mit ClustalW 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) und MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). (B) Sequenzabgleich der katalytischen Domäne von Paarungs- und Morphogenese-regulierenden DSP sowie *U. maydis* Mkp2 (Um02303) und Rok1 (Um03701). Die Konsensussequenz der aktiven Domäne von Protein-Tyrosin Phosphatasen (HCXXXXXXR) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. (C) Schematische Darstellung der Proteinmerkmale von Rok1 und Mkp2 im Vergleich zu den Phosphatasen Msg5p, Cpp1 und Pmp1. Links ist die Proteingröße in Aminosäuren angegeben. Die Protein-Tyrosin Phosphatase Domäne dualer Spezifität (DSP) ist als graue Ellipse dargestellt. Der katalytisch aktive und hoch konservierte Teil der DSP-Domäne (vgl. (B)) ist mit einem senkrechten schwarzen Balken und weißer Raute markiert. Schraffierte Rechtecke geben putative PEST-Sequenzen an. Eine mögliche „Coiled-coil“-Domäne ist durch eine schwarze Ellipse gekennzeichnet. Weiße Kreise mit schwarzem Rand geben mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen (MAPK-P) an, die dem Konsensus L/PXS/TP (Clark-Lewis *et al.*, 1991) entsprechen. Stellen möglicher MAPK-Interaktion (D-Box) mit der Konsensussequenz R/KR/KX₂₋₆L/IXL/I sind durch schwarze Rauten gekennzeichnet. P-reiche Bereiche wurden mittels einer dicken, dunkelgrauen Linie und S-reiche Sequenzregionen mittels einer hellgrauen, dicken Linie markiert. Über den jeweiligen Proteinen sind die Aminosäurereste und -positionen der putativen Phosphorylierungsstellen (MAPK-P) angegeben. Unter den Proteinen ist jeweils die Position der ersten Aminosäure der MAPK-Interaktionskonsensussequenz (D-Box) angegeben. Die Analyse der potentiellen Erkennungssequenzen (MAPK-P und D-Box) erfolgte mittels Motivesuche in VectorNTI 9.0 (Invitrogen). PEST-Sequenzen wurden mit „PESTfind“ identifiziert (<https://embl.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>). Die Analyse der übrigen Proteinmerkmale erfolgte mittels der SMART-Suchmaschine (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). ad A)-C) Die nicht näher untersuchten *Ustilago*-Proteine sind über die angegebenen Annotationsnummern in der GENRE-Datenbank (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) zu finden (Rok1: um03701; Mkp2: um02303). Weitere Annotationen: Cpp1 (gb|EAL04854.1) von *C. albicans*; Pmp1 (emb|CAA20049.1) von *S. pombe*; Msg5 (sp|P38590.2), Ptp3 (gb|AAB70811.1) und Ptp2 (emb|CAA99423.1) von *S. cerevisiae*; Rok1 (gb|EAK84879.1) und Mkp2 (gb|EAK83103.1) von *U. maydis*.

Regulatoren der Pheromon-MAPK-, bzw. Zellintegrität-MAPK-Module in *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *C. albicans*, Msg5p, respektive Pmp1 und Cpp1, fallen in die Klasse der DSP. Mit Hilfe der Domänensuche in der SMART-Datenbank (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2008) konnten schließlich drei eindeutige DSP identifiziert werden (Um03701 (Rok1); Um02303 (Mkp2); Um00992; Abb. 7A). Unter diesen zeigten Rok1 (*Regulator of Kpp2 I*; 23,6% Identität) und Mkp2 (*MAP kinase phosphatase 2*; 22,9% Identität) die höchste Identität zu Msg5p aus *S. cerevisiae* (Abb. 7A).

2.3 Die Expression von *rok1* ist Pheromon-induziert

In *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass die DSP Msg5p, bzw. Pmp1 nach der Behandlung mit Pheromon transkriptionell induziert werden (Roberts *et al.*, 2000;

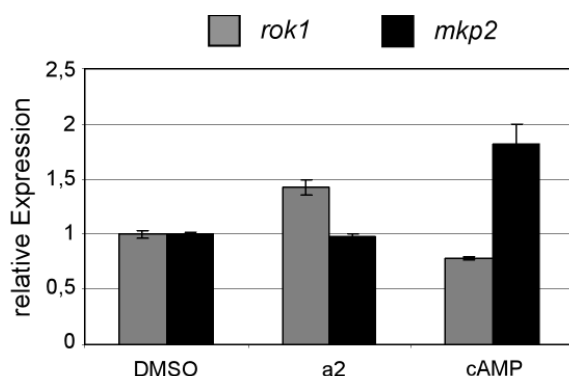


Abbildung 8: Die Expression von *rok1* ist durch Pheromon induziert. FB1 (*al b1*) Zellen 90 Minuten in CM-Glukose Medium mit 2,5µg/ml Pheromon, 6 mM cAMP oder der entsprechenden Menge an Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. In cDNA der jeweiligen Kulturen wurde mit genspezifischen Primern die Transkriptmenge von *rok1* oder *mkp2* relativ zum konstitutiv exprimierten Gen für die Peptidylprolyl-Isomerase (*ppi*; *um03726*) mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die Expression des jeweiligen Gens (*rok1* bzw. *mkp2*) in den DMSO-Kulturen ist gleich 1. Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier technischer Replikate wieder.

Mata und Bähler, 2006). In diesen Organismen aktivieren Pheromon-MAPK-Module also die Expression ihrer eigenen Repressoren und bilden so eine negative Rückkopplungsschleife. In genomweiten

Transkriptomanalysen wurden *um06187* und *rok1* als durch Pheromon differenziell reguliert gefunden, während *mkp2* keine Pheromon-abhängige transkriptionelle Regulation erfährt (Zarnack *et al.*, 2008). Für *rok1* konnten Zarnack *et al.* (2008) eine Pheromon induzierte sowie *fuz7DD* vermittelte, *kpp2* abhängige Induktion in zeigen.

um06187 wurde hingegen nach Pheromonbehandlung reprimiert (Zarnack *et al.*, 2008). Alle weiteren PTPs und DSPs waren in der Transkriptomanalyse von Zarnack *et al.* (2008) nicht Pheromon-abhängig reguliert. Dies deutete an, dass *rok1* als einzige Pheromon-induzierte DSP an der Regulation des Kpp2-MAPK-Moduls beteiligt sein könnte. Zur Bestätigung der Pheromon-abhängigen bzw. -unabhängigen Expression der beiden MSG5p-ähnlichen Phosphatasen Rok1 und Mkp2 wurden Expressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. In diesen Analysen wurde zusätzlich überprüft, ob *rok1* und *mkp2* durch den ebenfalls an der Pheromonantwort beteiligten cAMP-Signalweg reguliert werden. Hierzu wurde die relative Transkriptmengen von *rok1* und *mkp2* in Pheromon-, cAMP-behandelten und unbehandelten FB1-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt. *mkp2* zeigte keine differenzielle Expression nach Pheromonbehandlung (0.98 ± 0.013 fache Transkriptmenge nach $\alpha 2$ -Behandlung im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen; Abb. 8). Allerdings war die *mkp2*-Transkriptmenge nach Zugabe von 6mM cAMP ca. 1.8-fach induziert (Abb. 8). Das *rok1*-Gen hingegen war in $\alpha 2$ -Pheromon-behandelten Zellen 1.43 ± 0.069 mal höher exprimiert als in unbehandelten Zellen (1 ± 0.04), was die von Zarnack *et al.* (2008) gezeigte Pheromon-Induktion der *rok1* Expression bestätigt. In Zellen, die mit cAMP behandelt wurden (0.79 ± 0.016), konnte hingegen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (1 ± 0.04) eine leicht geringere *rok1*-Expression festgestellt werden (Abb. 8). Somit ist *rok1* das einzige Pheromon-induzierte Gen in *U. maydis*, das eine DSP kodiert. Da dies auf eine Rolle von Rok1 bei der Regulation der Pheromonantwort hindeutete, wurde die Pheromon-induzierten DSP *rok1* detaillierter analysiert und charakterisiert.

2.4 *rok1* inhibiert die Paarung kompatibler *U. maydis* Stämme

Um den Einfluss von *rok1* auf Pheromonantwort und Paarungskompetenz von *U. maydis* zu testen, wurde zunächst der offene Leserahmen von *rok1* in den kompatiblen, haploiden

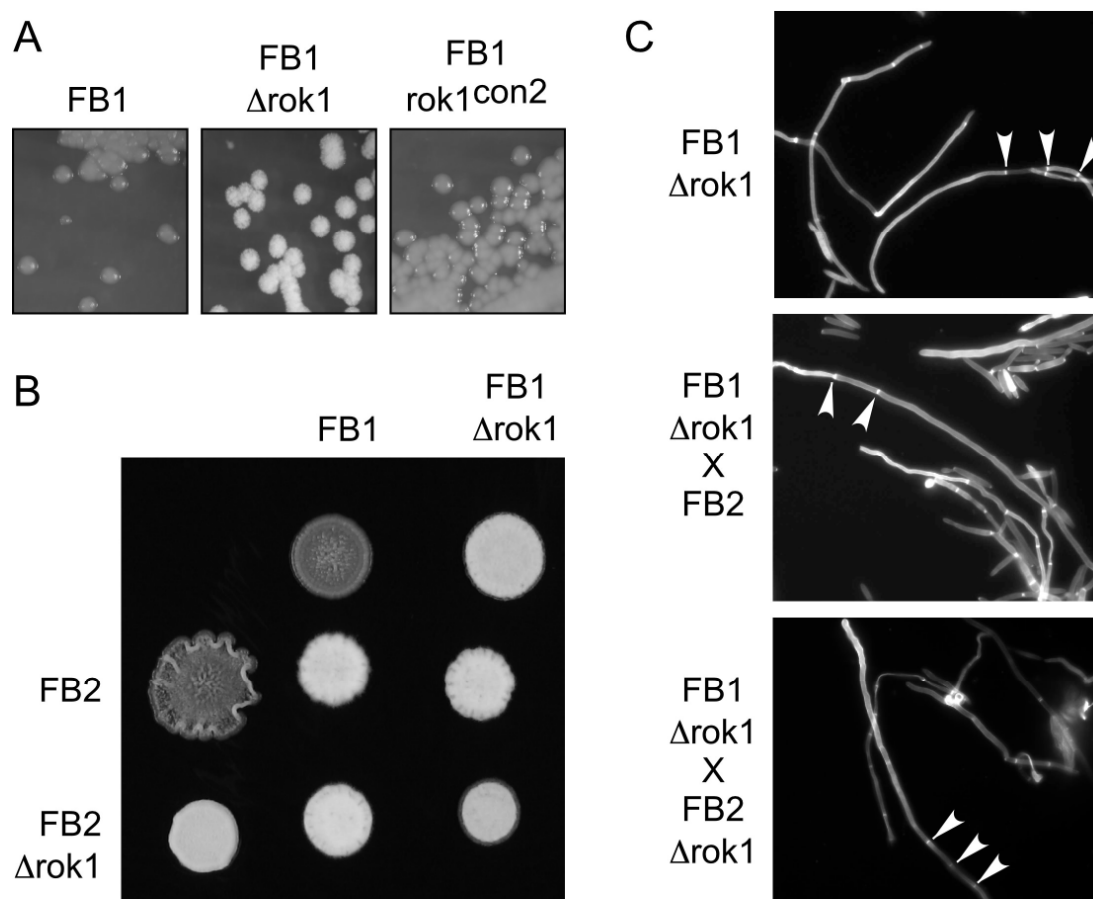


Abbildung 9: *rok1*-Deletionsmutanten zeigen filamentöses Wachstum (A) Die oben angegebenen Stämme sind FB1 (*al b1*) und Derivate. Sie wurden auf eine PD-Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation für 48 h bei 28°C wurden Bereiche mit Einzelkolonien fotografiert. (B) Die oben angegebenen FB1 (*al b1*) Stämme, *wt* und $\Delta rok1$ -Derivat, wurden allein oder in Mischung mit den links angegebenen FB2 Stämmen, *wt* und $\Delta rok1$ -Derivat, auf PD-Aktivkohle-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert. (C) Die links angegebenen FB1 und FB2 Derivate bzw. deren Mischungen wurden für 48 h bei 28°C auf PD-Aktivkohle-Festmedium inkubiert und die Zellen für die anschließende mikroskopische Analyse mit Calcofluor gefärbt. Weiße Pfeile markieren Septen.

Wildtypstämmen FB1 (*al b1*) und FB2 (*a2 b2*) deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Die resultierenden -Stämme FB1 $\Delta rok1$ und FB2 $\Delta rok1$ zeigten eine filamentöse Koloniemorphologie ohne kompatiblen Partner bereits auf PD-Medium

(Abb. 9A). Im Kreuzungstest auf Aktivkohle-haltiges PD-Medium wurden kompatible Mischungen aus Wildtyp- und *rok1*-Deletionsstämmen getestet. Unter diesen Bedingungen erscheint das Dikaryon, das aus der Fusion zweier kompatibler Sporidien hervorgeht, als weißes Filament. Dementsprechend entwickelte die Mischung aus FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) dicht gewachsene, pelzig Oberfläche (Abb. 9B). Da die *rok1*-Deletionsstämmen bereits ohne kompatiblen Partner eine filamentöse Kolonimorphologie aufwiesen (Abb. 9B), war eine Bewertung des Einflusses der *rok1*-Deletion auf die Zellfusion in Mischungen kompatibler Stämme nicht möglich. Um die Filamente haploider $\Delta rok1$ -Stämme von dikaryotischen Filamenten, die in Kreuzungen entstehen können, zu unterscheiden wurden die Zellen aus den Kreuzungstests mikroskopisch untersucht. Da die Hyphen der *rok1*-Deletionsmutante wie die Hyphen kompatibler Wildtypkreuzung Septierung zeigten, war auch hier eine Unterscheidung und somit eine Bewertung des Einflusses von *rok1* auf die Paarung kompatibler Stämme nicht möglich (Abb. 9C).

Der filamentöse Phänotyp der $\Delta rok1$ -Stämme könnte eine mögliche negative Regulation der Filamentbildung durch *rok1* andeuten. Um dies zu testen, wurden kompatible Stämme generiert, die den *rok1*-ORF ektopisch im *ip*-Locus unter der Kontrolle des konstitutiven

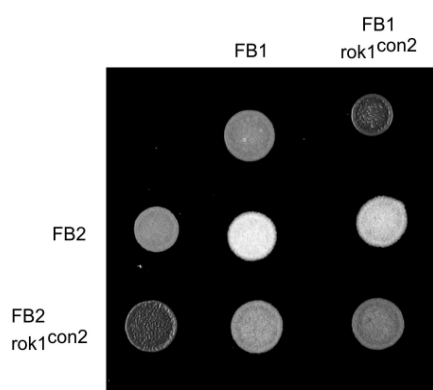


Abbildung 10: *rok1*-Deletionsmutanten zeigen filamentöses Wachstum Der oben angegebene FB1 (*a1 b1*) Stamm und FB1 $rok1^{con2}$, wurden allein oder in Mischung mit dem links angegebenen FB2 Stamm und FB2 $rok1^{con2}$, auf PD-Aktivkohle-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert.

o2tef-Promotors exprimieren. Die resultierenden Stämme FB1 $rok1^{con2}$ und FB2 $rok1^{con2}$ waren im Bezug auf ihre Zellmorphologie in CM-Glukose-Medium nicht von den jeweiligen Ausgangsstämmen zu unterscheiden (Abb. 9A). Auf Kolonieebene nach Wachstum auf PD-Medium zeigten sie jedoch einen „glossy“-Phänotyp (Abb. 9A), der bereits für $\Delta kpp2$ -Stämme beschrieben wurde (Müller *et al.*, 1999). Die $rok1^{con2}$ -Stämme wurden anschließend auf Aktivkohle-haltigem PD-Medium auf ihre Paarungskompetenz überprüft. Während die Mischung von FB1 $rok1^{con2}$ mit dem kompatiblen

Wildtypstamm noch zu einer - wenn auch stark verminderten - Ausbildung des Dikaryons führte, so zeigten die Mischungen kompatibler $rok1^{con2}$ -Stämme keine Ausbildung des weißen Luftmycels (Abb. 10). Die Überexpression von *rok1* führt somit zum Verlust der Paarungskompetenz kompatibler Stämme.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass *rok1* sowohl die Filamentation haploider Stämme als auch die Fusion und/oder *b*-abhängige Filamentation nach Kreuzung kompatibler Stämme inhibiert. Diese Resultate legen nahe, dass *rok1* eine entscheidende Funktion der Pheromon MAPK hat.

2.5 *rok1* spielt keine zentrale Rolle für die Stressregulation von *U. maydis*

Die DSP Msg5p ist in *S. cerevisiae* neben der Regulation der MAPK Fus3p ein zentraler Regulator der Zellwandintegritäts-MAPK Slt2p (Flández *et al.*, 2004). Die Deletion von *MSG5* führt in Hefe zu einer stark erhöhten Sensitivität gegenüber Substanzen, wie Congorot oder Calcofluor, die den Aufbau der Zellwand stören (Flández *et al.*, 2004). Um neben dem deutlichen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten eine mögliche Beteiligung von

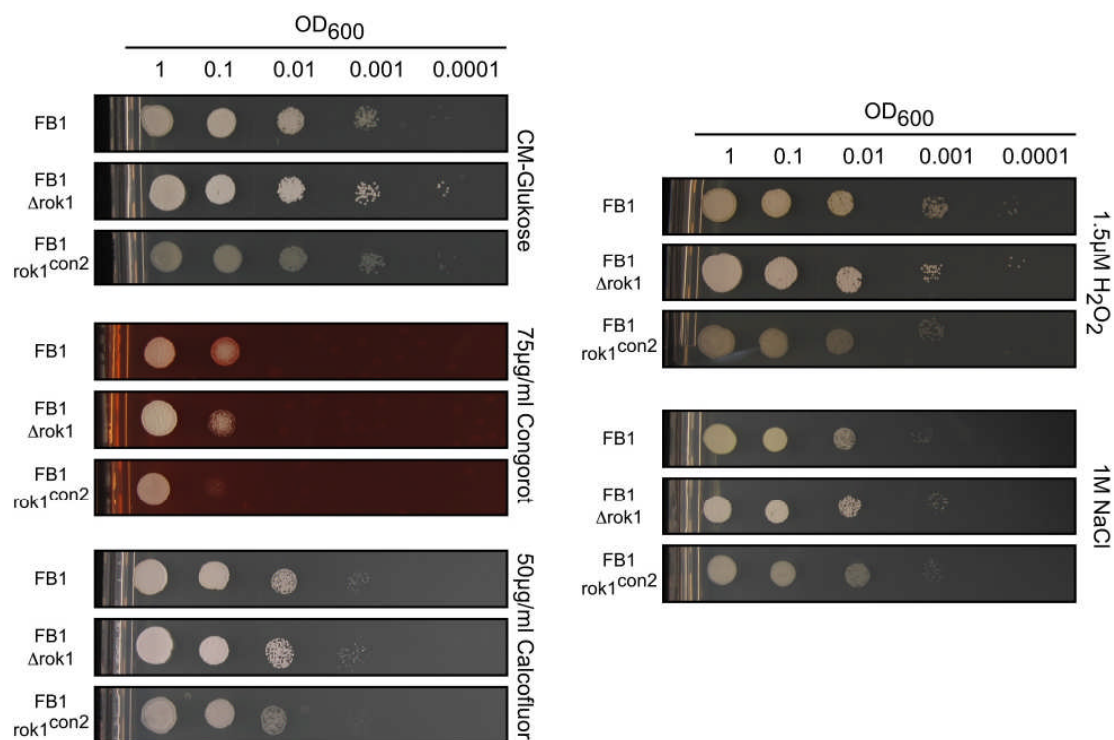


Abbildung 11: *rok1* hat keinen Einfluss auf die Stressresistenz von *U. maydis*. Auftragschema für den Test auf verschiedene Stresse. Die links angegebenen Stämme FB1 (*al b1*), *wt* und Derivate, wurden jeweils in der oben angegebenen Konzentration auf CM-Glukose-Festmedien mit den jeweils rechts angegebenen Stresssubstanzen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 28°C.

rok1 an der Stressantwort von *U. maydis* zu zeigen und somit Einblicke in die Spezifität der DSP Rok1 zu gewinnen, wurden die *rok1*-Deletions- sowie die *rok1*^{con2}-Stämme auf

ihre Sensitivität gegenüber Calcofluor, Congorot, NaCl und H₂O₂ getestet (Abb. 11). Die *rok1*-Deletionsmutante zeigt im Vergleich zum FB1 Wildtypstamm keine erhöhte Sensitivität gegenüber der getesteten Substanzen (Abb. 11). Der FB1*rok1*^{con2}-Überexpressionsstamm zeigte, bis auf eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Congorot, ebenfalls keine Unterschiede in der Stressantwort im Vergleich zu Wildtypstämmen (Abb. 11). Eine zentrale Rolle von *rok1* in der Regulation der getesteten Stressantworten ist demnach auszuschließen.

2.6 *rok1* reguliert die morphologische Pheromonantwort

Die Ausbildung von Konjugationshyphen ist der initiale Schritt in der Reaktion auf die Perzeption kompatiblen Pheromons. Um zu überprüfen ob *rok1* einen Einfluss auf diese

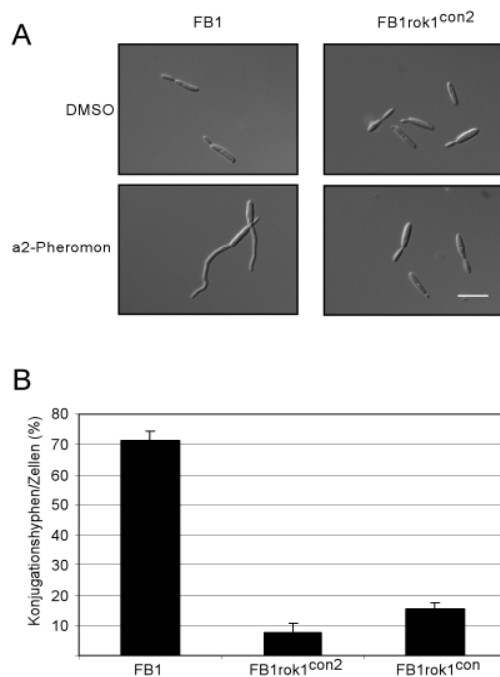


Abbildung 12: Die Überexpression von *rok1* reprimiert die Bildung von Konjugationshyphen. (A) Die oben angegebenen Stämme, FB1 (*alb1*; *wt*) und FB1rok1^{con}, wurden mit 2,5µg/ml synthetischem a2-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5h bei 28°C in PPN-Röhrchen unter leichtem Rotieren inkubiert. Der Größenstandard entspricht 20µm und bezieht sich auf alle Bilder. (B) Quantifizierung der Konjugationshyphenbildung in den unten angegebenen Stämmen. Die Balken geben den Anteil der Zellen an, die nach 5 h Stimulation mit a2-Pheromon mit der Bildung von Konjugationshyphen reagierten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten wider.

morphologische Pheromonantwort haploider Sporidien hat, wurden *rok1*-Überexpressionsstämme auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Konjugationshyphen auszubilden. Um zusätzlich den Einfluss der *rok1*-Kopienzahl auf die Konjugationshyphenbildung zu untersuchen, wurden Stämme mit ein bzw. zwei ektopischen Kopien von *rok1* untersucht. FB1rok1^{con} trägt nur eine *rok1*^{con}-Kopie im *ip*-Locus während FB1rok1^{con2} eine Integration von zwei Kopien trägt. FB1, FB1rok1^{con}- und FB1rok1^{con2}-Stämme wurden 5 Stunden mit synthetischem a2-Pheromon behandelt. Diese Stimulation induzierte in FB1 die Ausbildung von Konjugationshyphen. In *rok1*-Überexpressionstämmen hingegen war nur eine reduzierte morphologische Antwort zu beobachten (Abb. 12 A und B). Quantifizierungen bestätigten den mikroskopischen Eindruck. So bildeten 71,28%±3,16 der Wildtypzellen Konjugationshyphen, während nur 15,30%±2,21 der FB1rok1^{con} Zellen und

7,62%±2,94 der FB1rok1^{con2} Zellen morphologisch auf die Stimulation durch Pheromon reagierten (Abb. 11B). *rok1* reprimiert also die morphologischen Pheromonantwort in einer Gendosis-abhängigen Art und Weise.

2.7 *rok1* inhibiert die transkriptionelle Pheromonantwort

Neben der Ausbildung von Konjugationshyphen führt die Pheromonstimulation zu einer *prf1*-vermittelten transkriptionellen Induktion der *a*- und *b*- Paarungstypgene. Um zu testen ob *rok1*, neben der morphologischen auch den transkriptionellen Zweig der

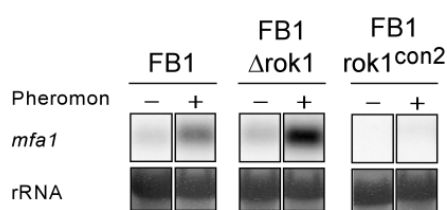


Abbildung 13: *rok1* reprimiert die transkriptionelle Pheromonantwort. FB1 (wt), FB1 Δ rok1 und FB1rok1^{con2} wurden mit 2,5µg/ml a2-Pheromon (+) oder der entsprechenden Menge DMSO (-) für 90 Minuten bei 28°C langsam rollend inkubiert. Die spuren wurden mit je 10g rna beladen und die Filter wurden mit einer *mfa1*-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Methylenblau gefärbte rRNA diente als Ladekontrolle.

Pheromonantwort beeinflusst wurde die *mfa1*-Expression in *rok1*-Deletions- und Überexpressionsstämmen getestet. Hierzu wurde RNA aus pheromonstimulierten und unbehandelten Wildtyp-, Δ rok1 und rok1^{con2}-Zellen isoliert und einer Northern-Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass in der *rok1*-Deletionsmutante die basale Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtypstamm leicht erhöht war (Abb. 13). Nach Pheromonstimulation zeigten FB1 Δ rok1-Zellen eine gegenüber Wildtypzellen stark erhöhte *mfa1*-Trankriptmenge (Abb. 13). Damit übereinstimmend war in FB1rok1^{con2}

weder eine basale noch ein Pheromon-induzierte Expression von *mfa1* nachweisbar (Abb. 13). Dies zeigt, dass *rok1* neben dem morphologischen Wechsel auch die transkriptionelle Pheromonantwort von *U. maydis* reprimiert.

2.8 *rok1* reguliert den morphologischen Wechsel unterhalb von *fuz7*

Die beobachtete Inhibition der Konjugationshyphenbildung durch Überexpression von *rok1* könnte durch das Ausbleiben der Pheromon-abhängigen α -Genexpression erklärt werden. Dies würde dazu führen, dass das Pheromonrezeptorgen nicht exprimiert wird und die Zelle somit nicht in der Lage ist das Pheromonsignal wahrzunehmen. Somit könnte der Einfluss der *rok1*-Überexpression auf die Konjugationshyphenbildung indirekt sein. Um eine von der α -Genexpression unabhängige, direkte Beteiligung von *rok1* an der morphologischen Pheromonantwort zu beweisen wurden die Eigenschaften von Stämmen mit einer induzierbaren konstitutiv aktiven MAPKK Fuz7DD genutzt (Müller *et al.*, 2003). Durch den regulierbaren Promotor des Arabinasegens *crg1* (P_{crg1}) wird in diesen Stämmen eine kontrollierbare Expression des *fuz7DD*-Allels gewährleistet. Während die Aktivität dieses Promotors in Anwesenheit von Glukose fast vollständig reprimiert wird, führt Arabinose zu seiner Induktion (Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001). Durch die Arabinose-induzierte Expression von *fuz7DD* wird die MAPK Kpp2 aktiviert und die Zelle bildet Filamente aus, die alle Eigenschaften von Konjugationshyphen aufweisen (Müller *et al.*, 2003). Die Bildung dieser Filamente erfolgt unabhängig von *prf1* und der Perzeption

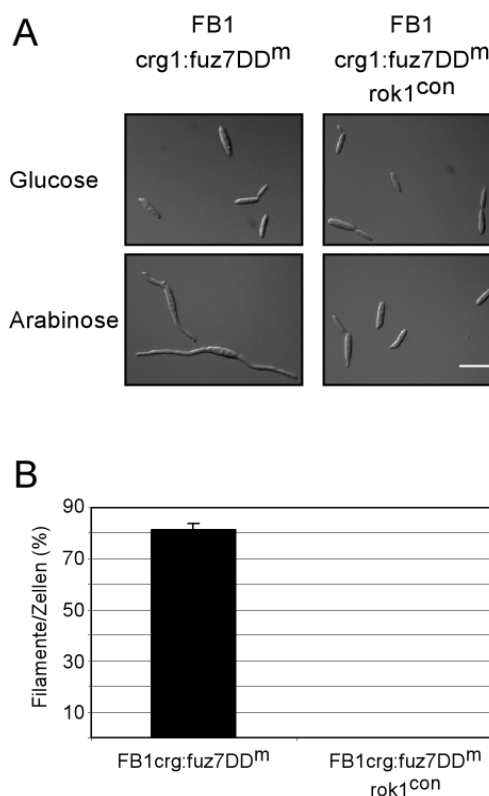


Abbildung 14: Die *rok1*-Überexpression reguliert die Konjugationshyphenbildung unterhalb von *Fuz7*. (A) Mikroskopische Aufnahmen von FB1crg:fuzDD^m (*al b1 mfa1::Pcrg1:fuzDD*) wt und *rok1*^{con}-Derivat nach 5 h Wachstum in CM-Glukose (obere Reihe) bzw. CM-Arabinose Medium (untere Reihe). Der Größenstandard entspricht 20µm und bezieht sich auf alle Bilder. (B) Quantifizierung der Konjugationshyphenbildung in den unten angegebenen Stämmen nach 5 h Wachstum in CM-Arabinose-Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten wider.

des Pheromonsignals (Müller *et al.*, 2003). Durch Konstruktion des Stammes FB1crg:fuz7DD^mrok1^{con} wurden somit Voraussetzungen zur Untersuchung einer Beteiligung von *rok1* an dem morphologischen Wechsel unabhängig von der Expression der *a*-Gene geschaffen. Alle untersuchten FB1crg:fuz7DD^m Stämme, Wildtyp und *rok1*^{con}, wuchsen in Anwesenheit von Glukose durch Knospung (Abb. 14A). Während der Wildtypstamm vier Stunden nach Transfer in Medium mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wie erwartet Konjugationshyphen-ähnliche Filamente ausbildete, blieb der morphologische Wechsel in Zellen, die *rok1* überexprimierten, aus (Abb. 14A und B). Dies zeigt, dass *rok1* die morphologische Pheromonantwort unterhalb der MAPKK Fuz7 negativ reguliert.

2.9 cAMP inhibiert die Filamentation von $\Delta rok1$ -Stämmen

In *U. maydis* wird das filamentöse Wachstum antagonistisch von cAMP und MAPK-Signalweg reguliert: das filamentöse Wachstum von *uac1*-Mutanten kann z.B. durch die Deletion von Komponenten des Kpp2-MAPK-Moduls supprimiert werden (Gold *et al.*,

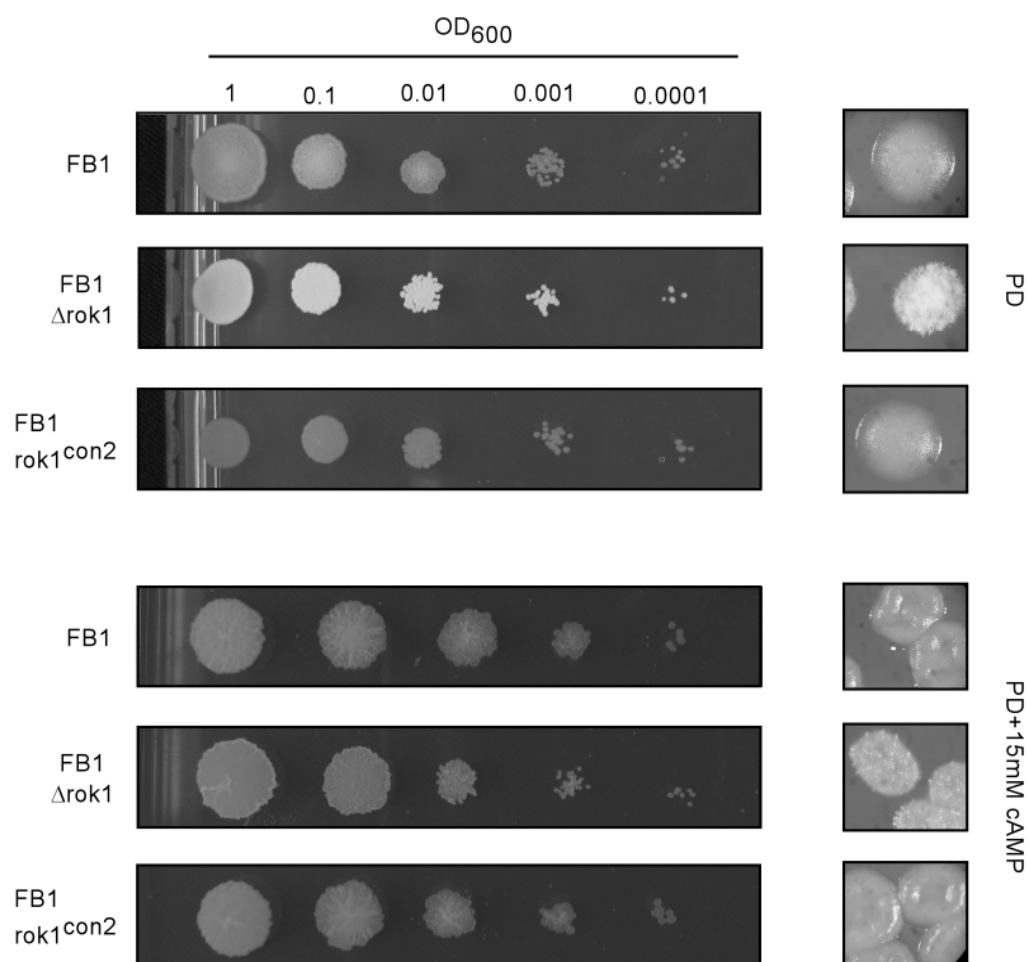


Abbildung 15: Externes cAMP suppressiert die Filamentation von $\Delta rok1$ Mutanten. Die links angegebenen FB1 Derivate wurden in YEPSL zu einer $OD_{600}=0.8$ angezogen und auf $OD_{600}=1.0$ in H_2O resuspendiert, seriell verdünnt und 5 μl Suspension mit der oben angegebenen OD_{600} auf PD Medium ohne und mit 15 μM cAMP getropft. Nach einer Inkubation für 48 Stunden bei 28°C wurden die Platten (links) und Einzelkolonien (rechts) fotografiert.

1994; Mayorga and Gold, 1999; 2001), die Zugabe von 15mM cAMP inhibiert die Bildung von Konjugationshyphen (Müller, 2003) und die Bildung von Filamenten nach genetischer Aktivierung des Kpp2-MAPK-Moduls durch Expression des konstitutiv aktiven *fuz7DD*-

Allels lässt sich ebenfalls durch cAMP unterdrücken (T. Brefort, persönliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob cAMP auch antagonistisch auf die Filamentation von *Δrok1*-Stämmen wirkt, wurden der Stamm FB1 und seine Derivate, FB1 Δ rok1 und FB1rok1^{con2} auf cAMP-haltige CM-Glukose Platten getropft. Durch Zugabe von 15mM cAMP wurde die Filamentation von FB1 Δ rok1 auf CM-Glukose-Agarplatten fast vollständig unterdrückt (Abb. 15). Dies zeigt, dass cAMP die durch die *rok1*-Deletion hervorgerufene Filamentation unterdrückt.

2.10 *rok1* beeinflusst den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 und Kpp6

Alle bisherigen Ergebnisse machen eine Beteiligung von *rok1* an der Regulation der Kpp2-MAPK-Aktivität wahrscheinlich. Die Aktivierung dieses zentralen Regulators der Pheromonantwort und nachfolgender Zellfusion erfolgt über Phosphorylierung des konservierten TEY-Motivs durch die MAPKK Fuz7 (Müller *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung kann mit einem Phosphor-spezifischen Antikörper (α -p44/42) nachgewiesen werden, der spezifisch die Phosphorylierung des TEY-Motivs von MAPKs aus der Erk1/2-Familie bindet (Müller *et al.*, 2003). Um zu analysieren, ob *rok1* den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 beeinflusst, wurden die Stämme FB1, FB1 Δ rok1 und FB1rok1^{con2} 5 bis 90 Minuten mit α 2-Pheromon bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Proteinextrakte aus diesen Zellen wurden per Western-Analyse auf die Phosphorylierung von Kpp2 untersucht. In den DMSO-Kontrollen war in keinem der untersuchten Stämme ein Signal mit dem α -p44/42-Antikörper zu detektieren (Abb. 16A bis C). Hingegen konnte nach 30 Minuten Pheromonbehandlung in FB1 Zellen phosphoryliertes Kpp2 nachgewiesen werden, die Intensität dieses Signals sank nach 60 Minuten ab und war nach 90 Minuten fast völlig verschwunden (Abb. 16A). In FB1 Δ rok1 Extrakten war die Phosphorylierung von Kpp2 bereits nach 15 Minuten Pheromonbehandlung festzustellen (Abb. 16B). Die Signalstärke stieg nach 30 und 60 Minuten weiter an und das erreichte Niveau lag deutlich über der im Wildtyp detektierten Kpp2-Phosphorylierung (Abb. 16A und B). Nach 90 Minuten war auch in FB1 Δ rok1-Zellen keine Phosphorylierung von Kpp2 mehr nachzuweisen. In den Extrakten der *rok1*-Deletionsmutante war nach 60 und 90 Minuten ein zweites, sehr markantes Signal sichtbar

(Abb. 16B). Die aus dem Laufverhalten abgeleitete molekulare Masse dieser phosphorylierten MAPK, deutet darauf hin, dass es sich um die MAPK Kpp6 (59kDa) handeln könnte (Abb. 16B). Auch in Extrakten aus FB1-Zellen war nach 60 und 90 Minuten Pheromonbehandlung ein schwaches Signal mit der gleichen molekularen Masse erkennbar (Abb. 16A). Diese im Vergleich zu Kpp2 zeitverzögert auftretenden

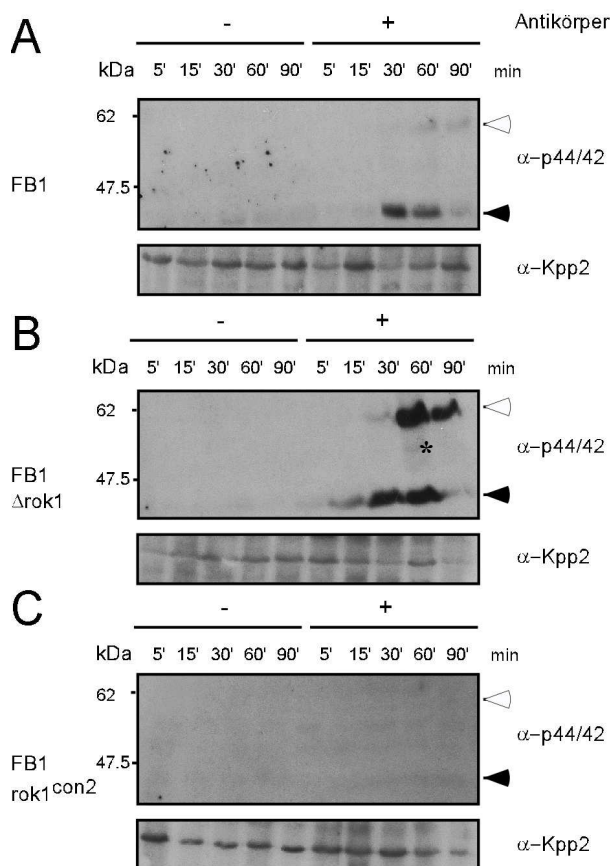


Abbildung 16: *rok1* reguliert den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 und Kpp6. (A)-(C) Die links angegebenen Stämme wurden für 5 bis 90 Minuten mit 2,5 µg/ml synthetischem a2-Pheromon (+) oder der entsprechenden Menge DMSO (-) behandelt. Proteinextrakte der Kulturen wurden mit einem Phosphospezifischm (α-p44/42) auf die Phosphorylierung von MAPK untersucht. Je Spur wurden 15µg Gesamtprotein geladen. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit Kpp2-Antikörper hybridisiert. Die Laufhöhe von Kpp2 ist mit einem schwarzen, die von Kpp6 mit einem weißen Pfeil und die von Um10107 (Slf2p-homolog) mit einem Stern markiert.

Phosphorylierung von Kpp6 (Abb. 16A und B) erklärt sich aus der bereits beschriebenen *kpp2*-abhängigen Expression von *kpp6* (Brachmann *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). In Extrakten aus dem *rok1*-Überexpressionsstamm (FB1rok1^{con2}) war zu keinem Zeitpunkt ein Signal für MAPK-Phosphorylierung detektierbar (Abb. 16C). Zusätzlich war in FB1Δrok1 nach 60 Minuten Pheromonbehandlung ein schwaches Signal zu detektieren, dessen Laufverhalten die Vermutung zulässt, dass es sich um die Slf2p-homologe MAPK Um10107 (50,5kDa) handelt. Um Kpp2-Protein nachzuweisen, wurden parallele Westernanalysen der selben Extrakte mit einem Kpp2-spezifischen Antikörper

(Müller, 2003) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Menge an Kpp2 in den Extrakten des FB1-Wildtypstammes relativ konstant blieb (Abb. 16A). Jedoch zeigte sich, dass in den Extrakten mit dem intensivsten Phosphorylierungssignal nach 60 minütiger

Pheromonbehandlung die Proteinmenge am geringsten war (Abb. 16A). In den Extrakten aus FB1 Δ rok1 und FB1rok1^{con2} war nach 90 Minuten Pheromonbehandlung kaum Kpp2 Protein zu detektieren (Abb. 16B und C), d. h. das fehlende Phosphorylierungssignal in diesen Extrakten ist darauf zurückzuführen, dass kein Kpp2-Protein vorhanden ist. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass *rok1* die Phosphorylierung von Kpp2 und Kpp6 sowie möglicherweise von Um10107 negativ beeinflusst. Rok1 ist also ein zentraler Regulator der beiden verwandten MAPKs Kpp2 und Kpp6 und hat möglicherweise weitere Targets.

2.11 Die Deletion von *rok1* kann Δ *kpp2*-Defekte in Paarungskompetenz und Konjugationshyphenbildung nicht supprimieren

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass *rok1* die Paarung und Pheromonantwort von *U. maydis* negativ beeinflusst. Weiter konnte gezeigt werden, dass *rok1* unterhalb von Fuz7 auf die morphologische Pheromonantwort wirkt (vgl. Abschnitt 2.7) und den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 und Kpp6 reguliert (vgl. Abschnitt 2.10.). Um zu überprüfen, ob *kpp2* auch in *rok1*-Deletionstämmen essentiell für Fusion und Filamentation ist, oder ob hier eine zweite, zu Kpp2 redundante MAPK diese Funktion übernimmt, wurden Δ *kpp2*- Δ rok1-Doppeldeletionsstämmen generiert. Hierzu wurde der offene Leserahmen von *rok1* in den kompatiblen Stämmen PM1 (*a1 b1* Δ *kpp2*; FB1 Δ *kpp2* in Abbildung) und PM2 (*a2 b2* Δ *kpp2*; FB2 Δ *kpp2* in Abbildung) deletiert. Die resultierenden Stämme wurden auf Aktivkohle-haltigem PD-Medium auf ihre Kreuzungskompetenz getestet. Während die Mischung kompatibler Wildtypstämmen unter diesen Bedingungen fusionieren und das weiße Luftmycel bilden, ist bei Mischung kompatibler *kpp2*-Deletionsstämmen keine Bildung des filamentösen Dikaryons zu beobachten (Müller *et al.*, 1999). Ebenso zeigten kompatible Δ *kpp2*- Δ rok1-Doppeldeletionsstämmen keinerlei Filamentation, d. h. sie waren nicht in der Lage das dikaryotische Filament auszubilden (Abb. 17A). Somit supprimiert die Deletion von *rok1* den Paarungsdefekt von Δ *kpp2*-Stämmen nicht. Das nicht filamentöse Wachstum der Doppeldeletionsmutanten zeigt weiter, dass *kpp2* essentiell für die Ausbildung von Δ rok1-Filamenten ist. Nach Behandlung mit kompatibelem, synthetischem Pheromon zeigten im

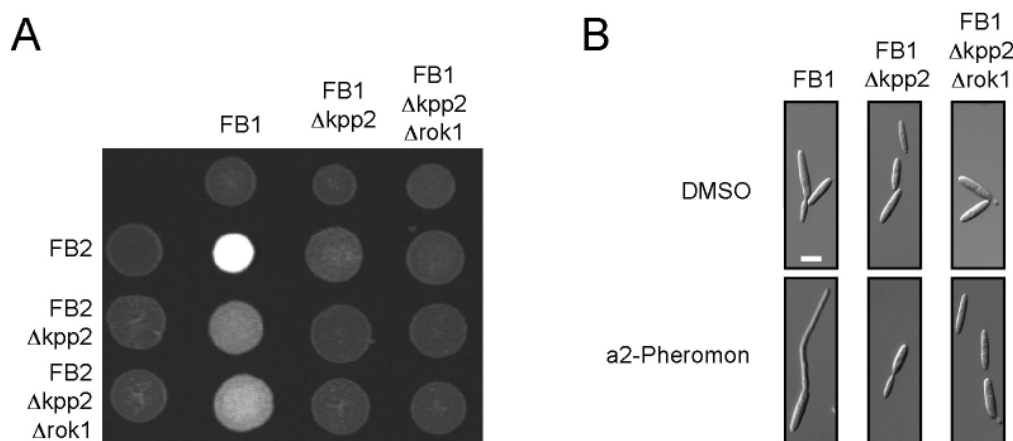


Abbildung 17: *rok1*-Deletionsmutanten können die Konjugationshyphen- und Paarungsdefekte von $\Delta kpp2$ nicht supprimieren. (A) Die oben angegebenen Stämme sind FB1 (*a1 b1*) und Derivate. Die links angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*; *wt*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere Reihe bzw. linke Reihe) oder in Mischung mit den kompatiblen Stämmen PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert. (B) Die oben angegebenen Stämme, FB1 (*wt*) und Derivate, wurden entweder mit 2,5 µg/ml synthetischem a2-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5 h bei 28°C unter leichtem Rotieren (50 Upm) inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Gegensatz zum FB1-Wildtyp weder die *kpp2*-Einzel-, noch die *kpp2-rok1*-Doppeldeletionsmutante Konjugationshyphenbildung (Abb. 17B). Damit ist *kpp2* auch in *rok1*-Deletionsmutanten essentiell für die Konjugationshyphenbildung und Paarung kompatibler Sporidien.

2.12 Die Deletion von *rok1* suppressiert die Pathogenitätsdefekte von *kpp2* und *kpp6* Einzelmutanten partiell

Die beiden MAP Kinasen Kpp2 und Kpp6 besitzen partiell redundante Funktionen in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003). Bei Einzelmutation von nur einem der beiden Gene kommt es zu einer Reduktion der Virulenz, während die Deletion beider Gene deren völligen Verlust zur Folge hat. Da *rok1* die Phosphorylierung und damit wahrscheinlich auch die Aktivierung beider MAP Kinasen negativ reguliert, wurde überprüft, ob die Deletion von *rok1* die Phänotypen von *kpp2* und *kpp6* Einzelmutanten sowie den Phänotyp der Doppeldeletionsmutante supprimieren kann. Um Effekte auf die von *rok1* regulierte Paarung auszuschließen, wurde der solopathogene

SG200-Stamm bzw. dessen Derivate benutzt. Dieser Stamm kodiert für ein aktives bE1/bW2-Heterodimer und besitzt zusätzlich zum *al*-Lokus das Gen für das kompatible Mfa2-Pheromon. Dadurch ist dieser solopathogene Stamm zur autokrinen Pheromonstimulation und der Bildung des b-Filaments in der Lage und infiziert Maispflanzen ohne vorherige Fusion mit einem kompatiblen Partner (Kämper *et al.*, 2006).

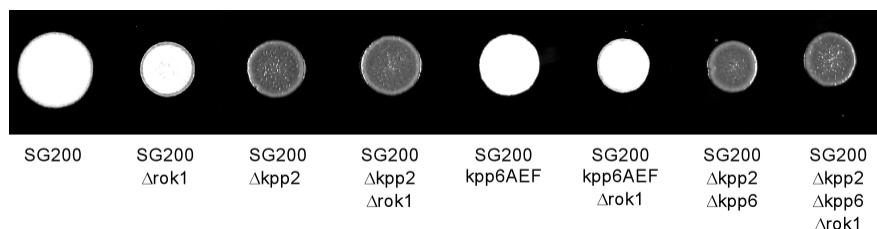


Abbildung 18: *rok1*-Deletion kann die Filamentation von *kpp2*-Mutanten nicht wieder herstellen. Die unten angegebenen Stämme sind SG200-Derivate. Sie wurden nach Wachstum in PD-Flüssigmedium auf eine Zelldichte von $OD_{600}=1,0$ in H_2O eingestellt. Von den resultierenden Zellsuspensionen wurden je 5 μl auf PD-Aktivkohle-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert.

Der offene Leserahmen von *rok1* wurde in den Stämmen SG200, SG200 Δ kpp2, SG200kpp6AEF und SG200 Δ kpp2 Δ kpp6 deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Um zu überprüfen, ob die Deletion von *rok1* die Ausbildung *b*-abhängiger Filamente beeinträchtigt, wurden die resultierenden Stämme zunächst auf Aktivkohlehaltige Agarplatten getropft. Hier bildeten sowohl SG200 Δ rok1 als auch SG200kpp6AEF Δ rok1 Filamente aus, die denen der entsprechenden Ausgangsstämme entsprachen (Abb. 18). Allerdings war in beiden Fällen der Koloniedurchmesser im Vergleich zum jeweiligen Vorgängerstamm reduziert (Abb. 18). In Stämmen, in denen *kpp2* fehlt (SG200 Δ kpp2; SG200 Δ kpp2 Δ kpp6) konnte durch Deletion von *rok1* der Filamentationsdefekt nicht supprimiert werden (Abb. 18).

Um zu ermitteln, ob die Deletion von *rok1* die reduzierte Pathogenität von *kpp2* und *kpp6* Mutanten supprimiert, wurden Maispflanzen mit den entsprechenden Stämmen infiziert.

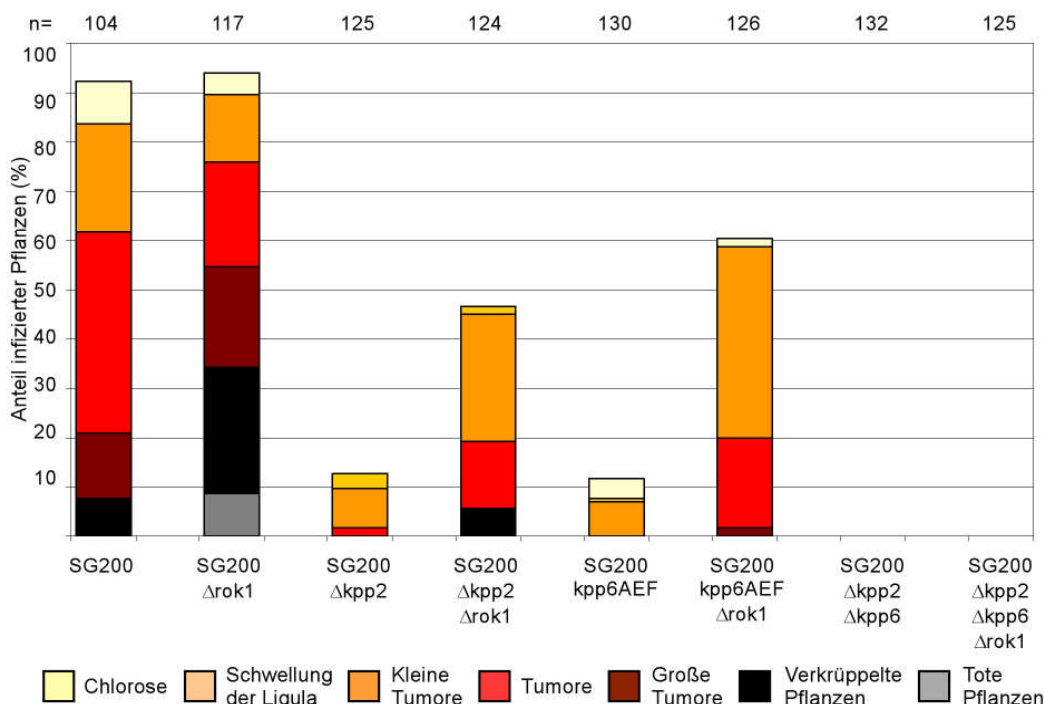


Abbildung 19: Die Deletion von *rok1* kann den Pathogenitätsdefekt von *kpp2* und *kpp6* Einzelmутanten supprimieren. Sieben Tage alte Maissämlinge wurden mit den unter den Säulen angegebenen Stämmen infiziert. Die Symptome wurden 12 nach der Infektion bewertet und in eine der unten angegebenen Kategorie eingeordnet. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Gesamtzahl an infizierten Pflanzen (n) ist über den Balken angegeben.

Sowohl die Virulenz von SG200 als auch die von SG200 Δ kpp2 und SG200kpp6AEF war durch die zusätzliche Deletion von *rok1* drastisch erhöht (Abb. 19). Die Virulenz von *kpp2-kpp6*-Doppeldelentionsmutanten konnte durch zusätzliche Deletion von *rok1* allerdings nicht wieder hergestellt werden (Abb.19). Diese Resultate zeigen, dass die Deletion von *rok1* die Virulenzdefekte von *kpp2* und *kpp6* Einzelmутanten supprimieren kann. Wahrscheinlich vermittelt die Hyperaktivierung der jeweils verbleibenden MAPK in den *rok1*-Deletionsmutanten die beobachtete partielle Suppression, d. h. dieser Effekt beruht auf der Anwesenheit der jeweils anderen MAPK und kann deshalb in *Δ kpp2 Δ kpp6 Δ rok1*-Stämmen nicht beobachtet werden.

2.13 *rok1* Deletionsmutanten zeigen eine drastisch erhöhte Virulenz

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass *rok1* eine zentrale Rolle in der Regulation der Pheromonantwort spielt. Unter natürlichen Bedingungen findet die *a*-abhängige Paarung kompatibler Sporidien auf der Blattoberfläche von Maispflanzen statt

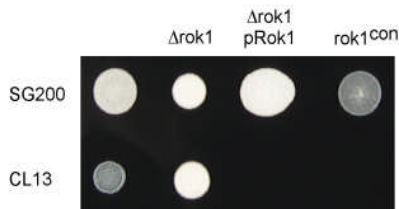


Abbildung 20: Einfluss von *rok1* auf die Filamentation von SG200 und CL13. Die oben angegebenen Stämme sind SG200 (*a1:mfa2 bE1 bW2*) Derivate; die unten angegebenen Stämme sind CL13 (*a1 bE1 bW2*) Derivate. Die Stämme wurden allein auf PD-Aktivkohle-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert.

und ist Voraussetzung für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Da *rok1* die Pheromonantwort reprimiert, sollte überprüft werden, ob die Deletion von *rok1* Auswirkungen auf die Pathogenität kompatibler Stämme zeigt. Um dies zu testen, wurden Pflanzen mit Mischungen von FB1 und FB2 *rok1*-Deletionsstämmen infiziert. Hier zeigte sich, dass die Mischung kompatibler *rok1*-Deletionsstämmen eine deutlich höhere Tumorraten (96,20%±2,71) als die Wildtyp-Kreuzung (83,78%±11,21) verursachte (Abb.

22). Interessanterweise war auch der Anteil an Pflanzen mit großen Tumoren drastisch erhöht (Abb. 22). Da Hypervirulenz auch nach Infektion mit SG200Δ*rok1* beobachtet wurde (Abb. 21 und 22) kann dieser Phänotyp nicht allein auf eine effizientere Paarung der kompatiblen Deletionsstämmen zurückgeführt werden.

Um einen reprimierenden Einfluss von *rok1* auf postfusionale Prozesse während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* zu überprüfen, wurde *rok1* im *ip*-Locus von SG200 unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors überexprimiert. Auf Aktivkohlehaltige Agarplatten zeigte der resultierende Stamm SG200*rok1*^{con} im Vergleich zu SG200 reduzierte Filamentation (Abb. 20). Ebenso wurde nach Infektion mit SG200*rok1*^{con}-Stämmen eine starke Attenuation der Virulenz beobachtet (11,32%±4,63), während der SG200-Ausgangsstamm eine Infektionsrate von 86,82%±2,21 zeigte (Abb. 21). Dies verdeutlicht, dass *rok1* neben der Paarungskompetenz zusätzlich die Virulenz von *U. maydis* negativ reguliert.

Um zu überprüfen ob der reduzierte Kolonieradius auf Aktivkohle-Tropfplatten und die erhöhte Virulenz der SG200Δ*rok1*-Stämme tatsächlich auf den Verlust des *rok1*-Gens zurückzuführen sind, wurde das Plasmid pRok1 in singulärer Kopie in den *ip*-Locus des

Stammes SG200 Δ rok1 eingebracht. Das pRok1 Konstrukt beinhaltet den *rok1*-ORF inklusive von 221bp des 3'-untranslatierten Bereichs unter Kontrolle des nativen Promotors. Der daraus resultierende Stamm (SG200 Δ rok1pRok1) wurde auf Filamentation und Pathogenität getestet. Die Integration des Plasmids in SG200 Δ rok1 komplementierte

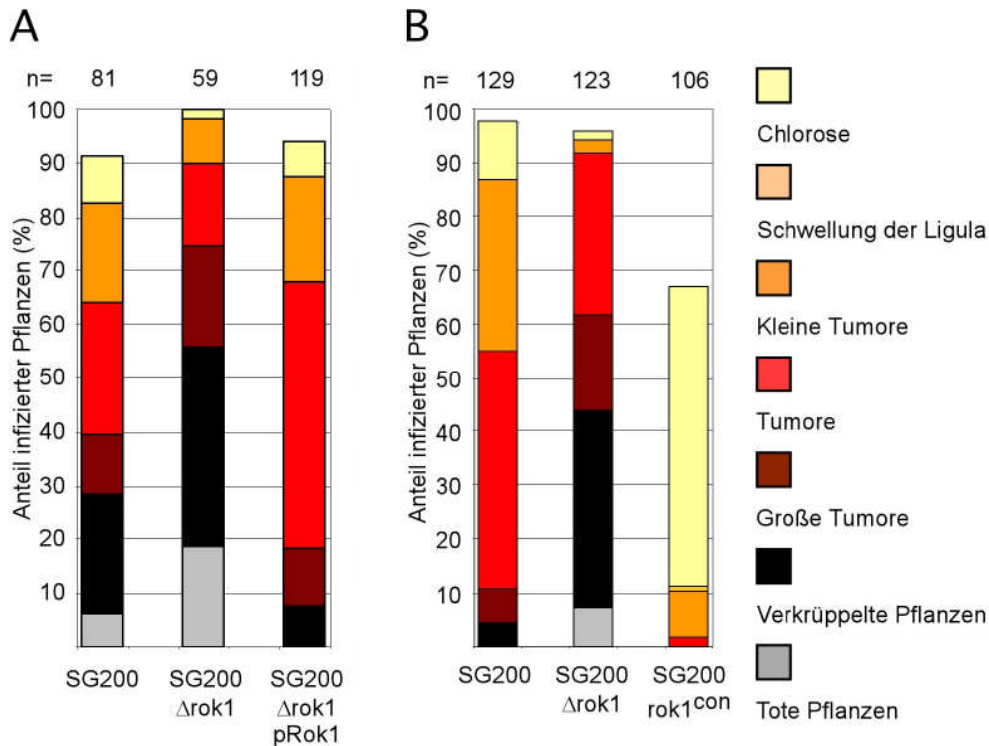


Abbildung 21: Komplementation des Δ rok1-Phänotyps. (A) und (B) Sieben Tage alte Maissämlinge wurden mit den unter den Säulen angegebenen Stämmen infiziert. Die Symptome wurden 12 nach der Infektion bewertet und in eine der rechts angegebenen Kategorien eingeordnet. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Gesamtzahl an infizierten Pflanzen (n) ist über den Balken angegeben.

sowohl die reduzierte Koloniegröße (Abb. 20) als auch die erhöhte Virulenz (Abb. 21). Dies liefert den Beweis, dass die beobachteten Effekte auf der Deletion des Rok1-Gens beruhen.

2.14 Die Deletion von *rok1* ersetzt die fehlende autokrine Pheromonstimulation in CL13

Die Deletion von *rok1* erhöht sowohl die Virulenz kompatibler Stämme als auch die des solopathogenen SG200-Stammes. In beiden Fällen spielt die Pheromon-Stimulation

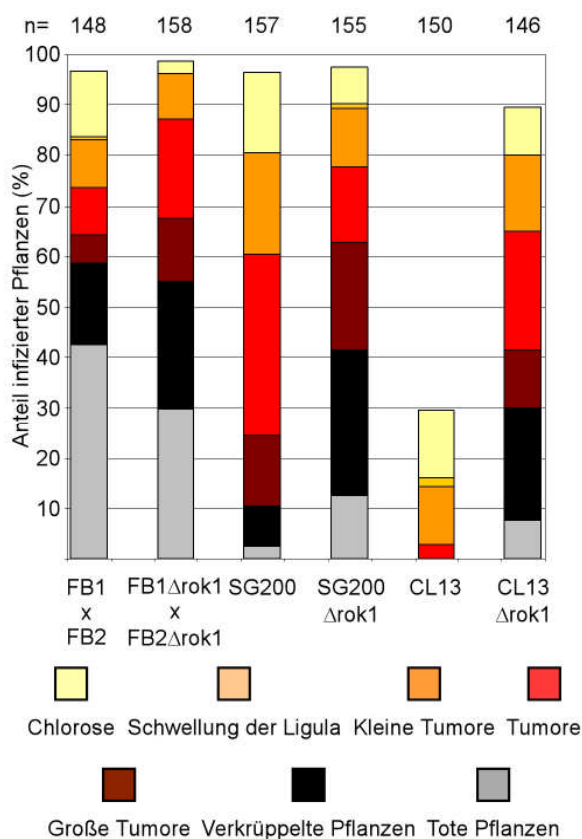


Abbildung 22: Die Deletion von *rok1* kann den Pathogenitätsdefekt durch fehlende Pheromonaktivierung supprimieren. Sieben Tage alte Maissämlinge wurden mit den unter den Säulen angegebenen Stämmen infiziert. Die Symptome wurden 12 nach der Infektion bewertet und in eine der unten angegebenen Kategorie eingeordnet. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus 4 unabhängigen Experimenten. Die gesamtzahl an infizierten Pflanzen (n) ist über den Balken angegeben.

autokrin oder durch den Kreuzungspartner, eine entscheidende Rolle. In vorangegangenen Experimenten (vgl. 2.3, 2.5. bis 2.7.) konnte gezeigt werden, dass *rok1* die Pheromonantwort negativ reguliert und sogar zur Filamentation der haploiden Stämme FB1 und FB2 führt (vgl. 2.3.). All diese Phänotypen lassen sich durch eine Hyperaktivierung der MAPK-vermittelten Pheromonantwort in $\Delta rok1$ -Stämmen erklären. Es stellte sich nun die Frage, ob die Deletion von *rok1* die für volle Virulenz notwendige Pheromonstimulation ersetzen kann. Um dies zu überprüfen, wurde der *rok1*-ORF im Stamm CL13 deletiert. CL13 kodiert, wie SG200, für ein aktives bE1/bW2-Heterodimer, besitzt

allerdings kein Gen für das kompatible Mfa2-Pheromon (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006). Der CL13-Stamm ist somit im Gegensatz zu SG200 nicht zur autokrinen Pheromonstimulation in der Lage. Daraus resultiert eine nur basale Expression des aktiven bE1/bW2-Heterodimers (Abb. 23). CL13 ist im Gegensatz zu SG200 nicht in der Lage im Tropftest auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten das weiße Luftmycel zu bilden und besitzt

eine im Vergleich zu SG200 stark attenuierte Pathogenität (Abb. 20 und 22). Die Deletion von *rok1* in CL13 führte zur Filamentation des Stammes auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten (Abb. 20). Auch die Infektionsrate von CL13 Δ rok1 ($80,19\% \pm 4,03$) war im Vergleich zu der von CL13 ($16,19\% \pm 10,13$) stark erhöht (Abb. 22). Die Tumorraten der CL13 Δ rok1-infizierten Pflanzen ähnelte damit der nach SG200-Infektionen beobachteten ($80,70\% \pm 8,76$), erreichte jedoch nicht die des SG200 Δ rok1-Stammes ($90,27\% \pm 2,98$; Abb. 22). Dies zeigt, dass die Deletion von *rok1* die Notwendigkeit für das Pheromonssignal zur vollen Virulenz von *U. maydis* ersetzen kann, wenn in der Zelle das aktive bE1/bW2-Heterodimer vorliegt.

2.15 Die Deletion von *rok1* führt zu einer erhöhten *bE*-Expression in SG200 und CL13

Die Expression eines aktiven bE1/bW2-Heterodimers ist entscheidend für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Kämper *et al.*, 1995). Die *b*-Genexpression wird, wie die Induktion der Gene des *a*-Locus, sowohl über den cAMP-Signalweg als auch über das

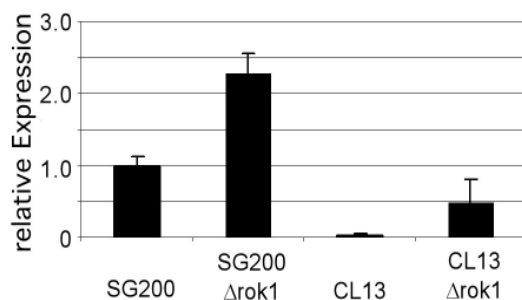


Abbildung 23: *rok1* inhibiert die *bE*-Expression. Die *bE*-Expression in den unten angegebenen Stämmen wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR-Analyse untersucht (durchschnittliche Expression in SG200 = 1; Details siehe Material und Methoden). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten an.

Pheromon-MAPK-Modul reguliert (Hartmann *et al.*, 1996). Um zu prüfen, ob durch die Deletion von *rok1* die transkriptionelle Induktion des *b*-Locus verstärkt wird, wurde das Expressionsniveau des *bE1*-Allels in SG200, SG200 Δ rok1, CL13 und CL13 Δ rok1 mittels quantitativer Realtime-PCR gemessen. Hierzu wurde RNA aus den entsprechenden Stämmen nach 24-stündiger Inkubation auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten isoliert. Die Expression von *bE1* in

CL13 unter diesen Bedingungen war etwa 25-mal geringer als in SG200 (Abb. 23). Die

Deletion von *rok1* verstärkte die *b*-Expression sowohl in SG200 Δ rok1 auf etwa das Doppelte als auch in CL13 Δ rok1 auf das 11 fache des jeweiligen Ausgangsstammes (Abb. 23). Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte Pathogenität von SG200 Δ rok1 und CL13 Δ rok1 auf die erhöhte *b*-Genexpression zurückzuführen ist.

2.16 Die Deletion von *rok1* führt nicht zur Pheromon-unabhängigen Zellfusion

Wie die bisher gezeigten Experimente gezeigt haben, ist *rok1* ein zentraler negativer Regulator der Pheromonantwort in *U. maydis*. Unter natürlichen Bedingungen ist die *a*-

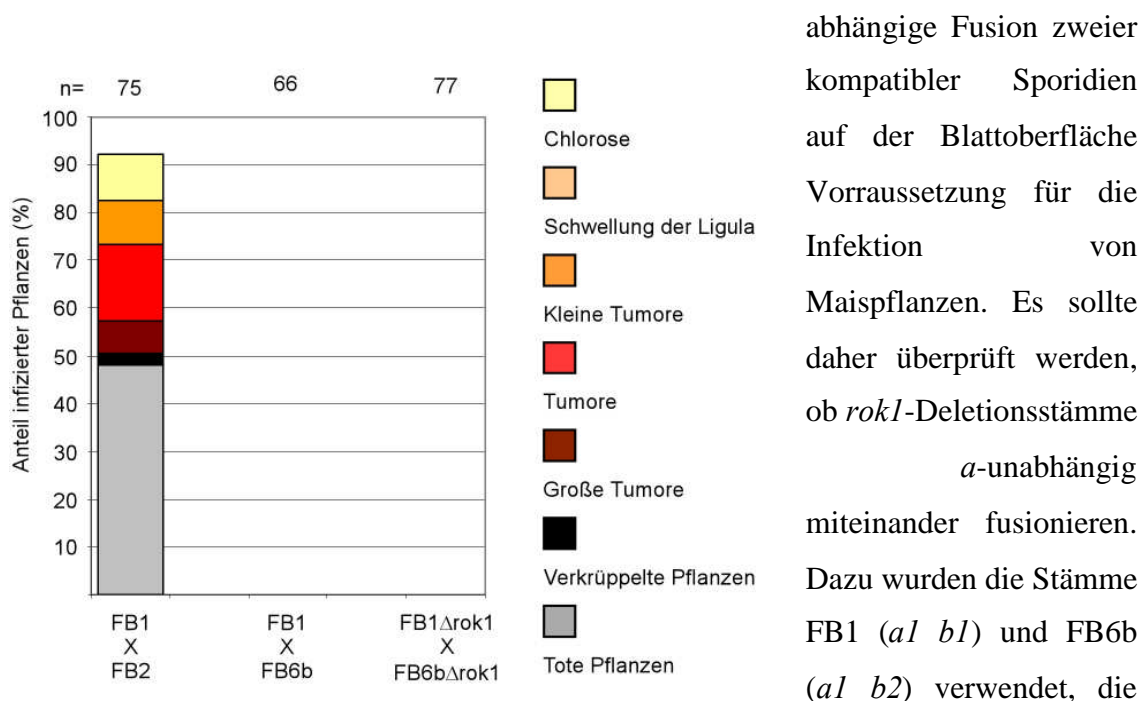


Abbildung 24: Kompatible *a*-Loci sind auch in *rok1*-Deletionsstämmen zur Zellfusion essentiell. Sieben Tage alte Maissämlinge wurden mit Mischungen der unten angegebenen Stämme infiziert. Die Symptome wurden 12 nach der Infektion bewertet und in eine der rechts angegebenen Kategorie eingeordnet. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Gesamtzahl an infizierten Pflanzen (n) ist über den Balken angegeben.

abhängige Fusion zweier kompatibler Sporidien auf der Blattoberfläche Voraussetzung für die Infektion von Maispflanzen. Es sollte daher überprüft werden, ob *rok1*-Deletionsstämme *a*-unabhängig miteinander fusionieren. Dazu wurden die Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB6b (*a1 b2*) verwendet, die zwar kompatible *b*-Loci aber den gleichen *a1*-Locus besitzen und daher inkompatibel sind (Banuett und Herskowitz, 1989). *rok1* wurde im FB6b-Stamm deletiert

und das Kreuzungsverhalten mit FB1 Δ rok1 überprüft. Da *rok1*-Deletionsstämme ohne Kreuzungspartner bereits filamentös wachsen (vgl. Abschnitt 2.3.), war es nicht möglich, die Fusion von FB1 Δ rok1 und FB6b Δ rok1 auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten zu

bewerten (Daten nicht gezeigt). Jedoch sollte eine Fusion dieser Stämme zur Bildung eines aktiven bE/bW-Heterodimers führen um somit die Entwicklung von Symptomen in der Maispflanze induzieren. Um eine Paarung der inkompatiblen $\Delta rok1$ -Stämme bewerten zu können, wurden Pflanzen mit einer Mischung von FB1 $\Delta rok1$ und FB6b $\Delta rok1$ infiziert. Als Kontrollen dienten Infektionen mit der Mischung aus FB1 und FB6b sowie die Mischung aus den kompatiblen FB1 und FB2 Wildtypstämmen, die in 92% der Pflanzen zum Ausbilden von Symptomen führte. Die Kombination aus FB1- $\Delta rok1$ - und FB6b- $\Delta rok1$ -Stämmen war hingegen, wie die der Mischung der jeweiligen Ausgangsstämme, apathogen. Damit kann die Deletion von *rok1* zwar die transkriptionelle Aktivierung des *b*-Locus durch kompatibles *Pheromon* ersetzen (vgl. Abschnitt 2.13.), führt jedoch nicht zu Pheromon-unabhängigen Zellfusion.

2.17 *rok1* reguliert die Ausbildung von Infektionsstrukturen

Die Infektion von Maispflanzen mit *U. maydis* beginnt mit der Penetration der Epidermis junger Blätter. Dabei differenziert sich das filamentös wachsende Dikaryon in sogenannte Appressorien. Diese Infektionsstrukturen bilden sich in der Regel 12 bis 24 Stunden nach Injektion auf dem dritten oder vierten Folgeblatt der jungen Maispflanze aus. Müller *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Integrität des Kpp2-MAPK-Moduls eine essentielle Voraussetzung für die Ausbildung dieser Strukturen ist. Um festzustellen, ob die erhöhte Filamentation und gesteigerte *b*-Genexpression von $\Delta rok1$ -Stämmen die einzige Ursache für die gesteigerte Virulenz ist oder ob auch spätere Schritte der biotrophen Entwicklung beeinflusst werden, wurde *rok1* in einem Stamm deletiert, der ein Markergen, AM1, für die Appressorienbildung trägt (SG200AM1). Dieser Stamm besitzt das *egfp-Gen* unter der Kontrolle des *um01779*-Promotors, welcher im Stadium der Appressorienbildung spezifisch aktiviert wird (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). Damit ist es möglich, die Anzahl der Appressorienbildenden Zellen anhand ihrer eGFP-Fluoreszenz zu bestimmen (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). Um die Effizienz der Appressorienbildung in

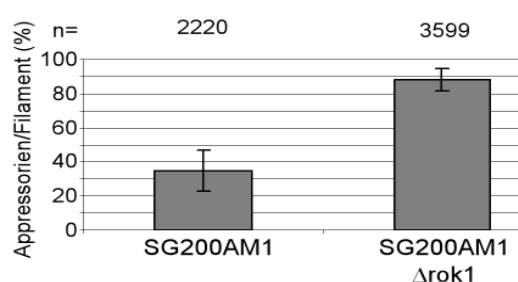


Abbildung 25: *rok1*-Deletionsmutanten zeigen eine erhöhte Appressorienbildungsrate. Die unten angegebenen Stämme wurden in junge Maispflanzen injiziert. Nach 18 Stunden wurden Pilzzellen auf dem dritten Folgeblatt infizierter Maispflanzen mit Calcofluor gefärbt. Mittels mikroskopischer Analyse erfolgte die Bestimmung des Anteils an Filamenten, die das Markergen der Appressorienbildung, AM1-eGFP, exprimierten und somit eGFP-Fluoreszenz zeigten. Die Balken geben die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionen wieder. Je Infektion und Stamm wurden Pilzzellen auf mindestens 3 Blättern untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten an.

SG200AM1 $\Delta rok1$ mit der von SG200AM1 zu vergleichen, wurden junge Maispflanzen mit diesen Stämmen infiziert. 18 Stunden nach Infektion wurde die Anzahl an filamentösen Zellen, die eGFP-Fluoreszenz zeigten, mit der Gesamtzahl filamentöse Zellen verglichen. Hier zeigte sich, dass der *rok1*-Deletionsstamm eine fast dreifach höhere Appressorienbildungseffizienz aufweist, als der entsprechende Ausgangsstamm (Abb. 25).

rok1 reguliert demzufolge auch die Bildung der Appressorien auf der Blattoberfläche negativ. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass Rok1 die Phosphorylierung von Kpp2 negativ beeinflusst, d. h. die MAPK, die sowohl Filamentation als auch Appressorienbildung reguliert.

2.18 Die Deletion von *rok1* führt zu einer erhöhten Kolonisierung des pflanzlichen Gewebes

In *U. maydis* wird die Pflanzenpenetration durch die MAPK Kpp6 kontrolliert (Brachmann *et al.*, 2003). Stämme, die für eine nicht aktivierbare Form der MAPK

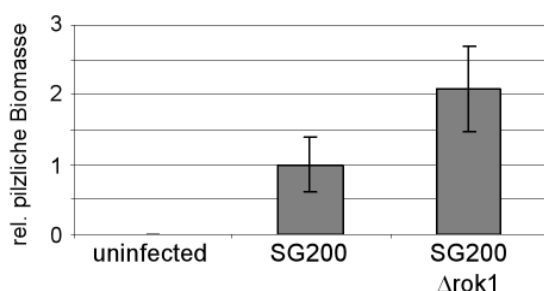


Abbildung 26: *rok1*-Deletionsmutanten zeigen eine effizientere Pflanzenkolonisierung. Sieben Tag alte Maispflanzen wurden mit den unten angegebenen Stämmen infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde ein 3 cm umfassender Bereich unterhalb der Einstichlöcher geerntet. Zellen auf der Pflanzenoberfläche wurden mit Latex entfernt und die DNA aus den Blättern isoliert. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Hierfür wurden *mfa1* spezifische Oligonukleotide zur Bestimmung des Anteils von *U. maydis* DNA im Vergleich zu Pflanzen DNA (Nachweis mit Mais-*GAPDH*-spezifischen Oligonukleotiden) genutzt. Als Kontrolle diente DNA aus uninfizierten Pflanzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten wider.

(Kpp6AEF) kodieren, sind in der Penetration der Pflanzencuticula gestört (Brachmann *et al.*, 2003). Da *rok1* auch den Phosphorylierungsstatus von Kpp6 reguliert, wurde die Auswirkung der Deletion von *rok1* auf die frühe Kolonisierung der Wirtspflanze untersucht. Hierzu wurde 2 Tage nach Infektion von Pflanzen mit SG200 und SG200 Δ rok1 die Menge an Pilzmaterial in der Pflanze bestimmt. Dazu wurden zunächst infizierte Bereiche, 3 cm unterhalb der Einstichstellen des 3. Folgeblattes ausgeschnitten und mit Hilfe von Flüssiglatex auf der Oberfläche haftende Zellen entfernt (Vranes, 2006). Nach DNA-Extraktion der Blätter wurde die

Menge an Pilz-DNA mit *mfa1*-spezifischen Oligonukleotiden und die Menge an Pflanzen-DNA mit Mais-*GAPDH*-spezifischen Oligonukleotiden (G. Döhlemann, persönliche

Mitteilung) in quantitativen Real-Time PCR Ansätzen bestimmt, um den relativen Anteil der Pilzbiomasse in den Blättern zu bestimmen. Es zeigte sich, dass in Blättern von SG200 Δ rok1-infizierten Pflanzen etwa 2-mal mehr pilzliche Biomasse vorhanden ist, als in Pflanzen, die mit SG200 infiziert wurden (Abb. 26). Die Deletion von *rok1* führt somit zu einer effizienteren Pflanzenkolonisierung.

2.19 *rok1* beeinflusst die Integration von Signalen, die zur Appressorienbildung führen

Wie in Abschnitt 2.16. gezeigt, führt die Deletion von *rok1* zu einer erhöhten Appressorienbildung auf der Pflanzenoberfläche. Um eine effiziente Appressorienbildung zu induzieren, benötigt *U. maydis* zwei Stimuli, eine hydrophobe Oberfläche und Fettsäuren (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass der Stimulus einer hydrophoben Oberfläche die Filamentation von SG200 induziert (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). Mendoza-Mendoza *et al.* (2008) konnten weiter zeigen, dass sich Appressorien *in vitro* induzieren lassen, wenn *U. maydis* mit 16-Hydroxy-Hexadecansäure (HDS) auf eine hydrophobe Oberfläche gesprüht wird. Unter diesen Bedingungen bilden 22,3%±6,6 der filamentierenden Zellen Appressorien (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008; Abbildung), während bei fehlender Stimulierung

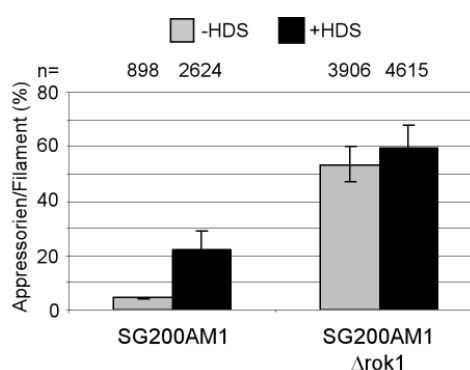


Abbildung 27: *rok1*-reguliert die Integration der Signale zur Induktion der Appressorienbildung.

Die unten angegebenen Stämme wurden mit (schwarzer Balken) und ohne (grauer Balken) 100nM 16-Hydroxy-Hexadecansäure (HDS) auf Parafilm aufgesprüht. Nach 18 Stunden Inkubation bei 28°C auf Parafilm wurden die Pilzhyphen mit Calcofluor gefärbt. Mittels mikroskopischer Analyse erfolgte die Bestimmung des Anteils an Filamenten, die das Markergen für die Appressorienbildung, AM1-eGFP, exprimierten und somit eGFP-Fluoreszenz zeigten. Die Balken geben die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten wieder. Je Experiment und Stamm wurden Pilzzellen auf mindestens 3 besprühten Parafilmflächen untersucht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

durch HDS nur $4,45\% \pm 0,29$ der Filamente Appressorien bilden (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008; Abb. 27). Der *rokI*-Deletionsstamm zeigte auch hier eine signifikant erhöhte Appressorienbildung von $59,8\% \pm 8$. Interessanterweise war hierfür der Stimulus der Fettsäure nicht nötig, d. h. SG200AM1 Δ rok1 bildet bereits ohne HDS auf hydrophobem Parafilm Appressorien in $53,4\% \pm 6,5$ der Filamente (Abb. 27). Dies zeigt, dass *rokI* an der Integration der Signale, die zur Ausbildung der Appressorien benötigt werden beteiligt ist.

2.20 Die Lokalisation von Rok1 ändert sich nach Pheromonstimulation

Rok1 reguliert die Phosphorylierung der MAPK Kpp2 und kontrolliert damit die

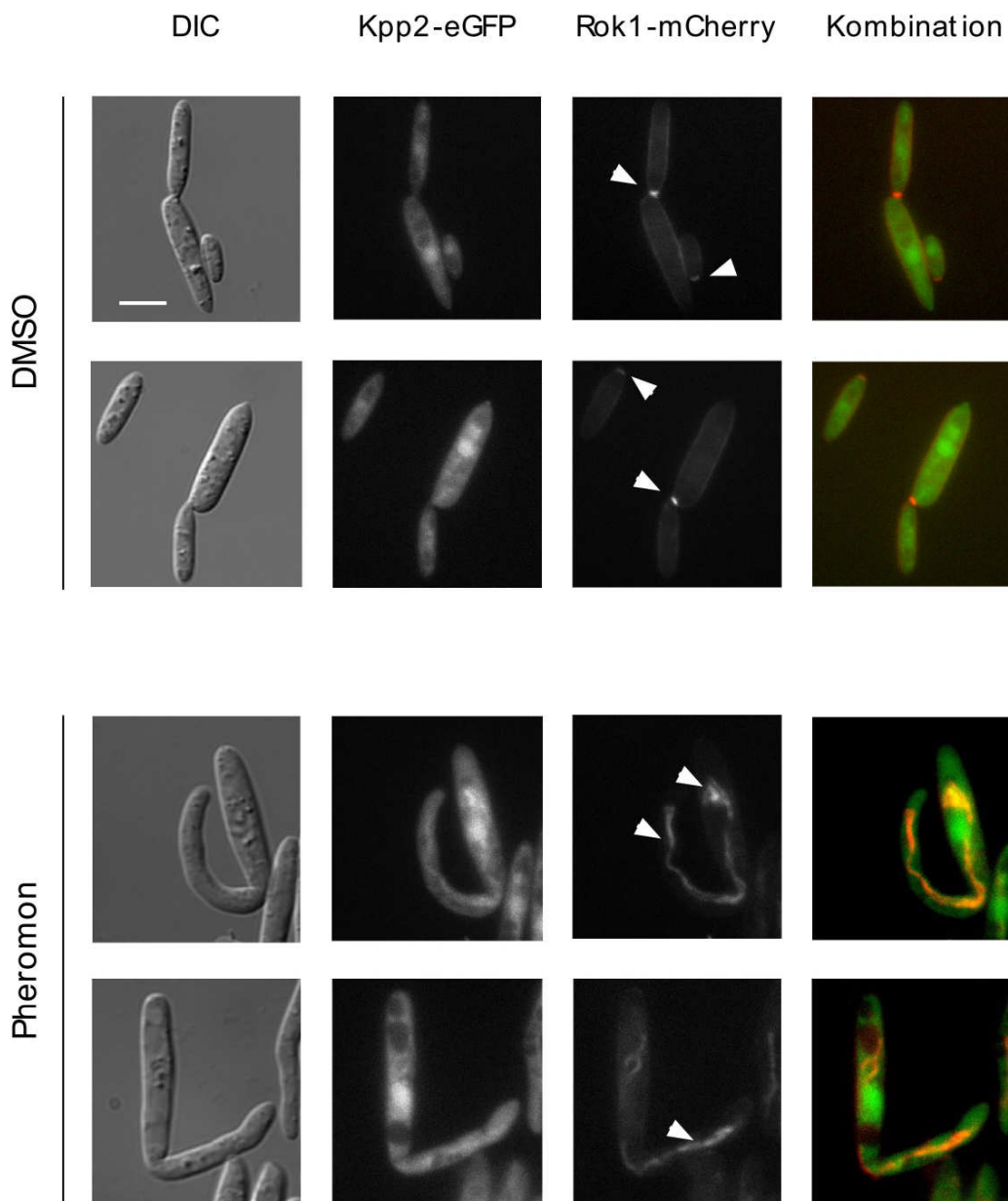


Abbildung 28: Rok1 zeigt eine differenzielle Lokalisation abhängig vom Pheromonstimulus. FB1kpp2-egfp rok1-mCherry (*alb1 kpp2:egfp rok1:mcherry*) wurde mit 2,5µg/ml synthetischem α 2-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 90 min bei 28°C in PPN-Röhrchen unter leichtem Rotieren inkubiert. Die Bilder wurden mit den oben angegebenen Filtern bei gleicher Vergrößerung aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 5µm und bezieht sich auf alle Bilder.

Pheromonantwort. Kpp2 akkumuliert nach Pheromonstimulation im Zellkern (Müller, 2003). Um die Lokalisation von Rok1 in *U. maydis* zu überprüfen, wurde ein Stamm hergestellt, der im *rok1*-Locus eine Fusion von Rok1 mit mCherry codiert. Um eine eventuelle Kolokalisation mit Kpp2 zu zeigen, codiert dieser Stamm zusätzlich für ein Kpp2-eGFP-Fusionsprotein im *kpp2*-Locus. Die resultierenden Stämme waren weder Zell- noch Koloniemorphologisch von dem Ausgangsstamm zu unterscheiden exprimierten das Rok1-mCherry-Fusionsprotein in voller Länge (Daten nicht gezeigt), d. h. die Fusion von Rok1 mit mCherry ist biologisch Aktiv. Die Lokalisation von Kpp2 und Rok1 wurde 90 Minuten nach Stimulation mit Pheromon bzw. mit DMSO als Kontrolle überprüft. Das in unstimulierten Zellen zytoplasmatisch lokalisierte Kpp2-eGFP-Fusionsprotein akkumulierte nach Pheromonstimulation im Zellkern (Abb. 28), was die Ergebnisse von Müller (2003) bestätigte. Zusätzlich konnte nach Pheromonstimulation eine Lokalisation von Kpp2-eGFP an Strukturen beobachtet werden, die die Zelle durchziehen und zum Teil eine tubuläre Struktur aufwiesen. Für das rot-fluoreszierende Rok1-mCherry-Fusionsprotein, lag hingegen in unbehandelten Zellen eine Lokalisation an der Plasmamembran vor, während in Zytoplasma und Zellkern kaum Fluoreszenz zu detektieren war. In einigen Zellen schien Rok1-mCherry, kurz vor Abschluss der Zytokinese, am Septum zu akkumulieren (Abb. 28). Interessanterweise, war nach Pheromon-Stimulation eine Anreicherung von Rok1-mCherry an teils tubuläre, die Zelle durchziehende Strukturen zu beobachten, die endoplasmatisches Reticulum (ER). darstellen könnten. Allerdings bedarf dies einer weiteren Überprüfung. Rok1 scheint nicht im Zellkern vorzuliegen. Diese Studien zeigen, dass sich das Rok1-mCherry Fusionsprotein nach Pheromonstimulation verändert.

2.21 Die Deletion des zweiten DSP-Gens, *mkk2*, führt zur Reduktion von Filamentation und Pathogenität

Die vorangehend dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass Rok1 ein zentraler Regulator der MAPKs Kpp2 und Kpp6 ist. Rok1 reguliert, wie DSP in anderen pilzlichen Systemen, die Inaktivierung dieser beiden *U. maydis* MAPK. Da in *Δrok1*-Zellen zwar eine deutliche Hyperphosphorylierung von Kpp2 und Kpp6 detektiert wurde, diese jedoch, wie in Wildtypzellen, nur transient auftrat, ist nicht auszuschließen, dass weitere Phosphatasen an der an der Inaktivierung von Kpp2, bzw. Kpp6 beteiligt sind. Ein

möglicher Kandidat für eine zu Rok1 redundante Phosphatase wäre die *U. maydis* DSP Mkp2, die ebenfalls Ähnlichkeit zu Msg5p aus *S. cerevisiae* besitzt (vgl. Abschnitt 2.1.).

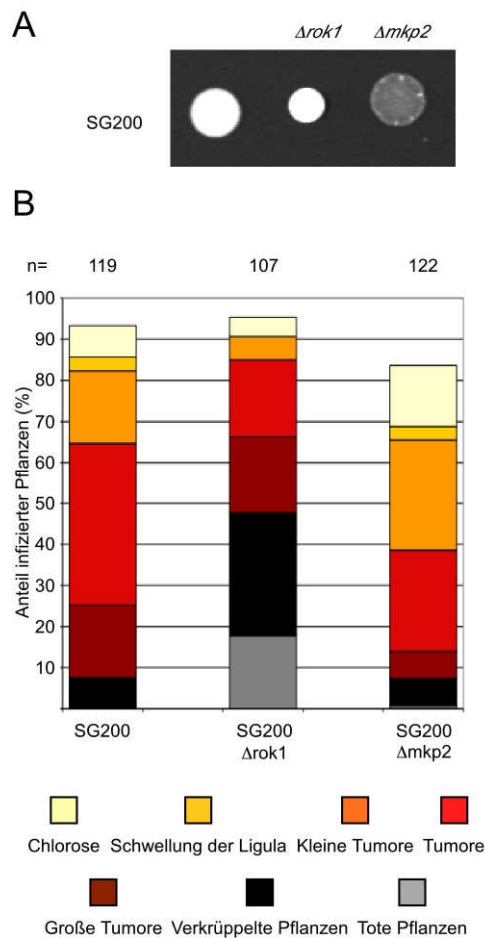


Abbildung 29: Die Deletion von *mkp2* führt zu einer verminderten Pathogenität von SG200. (A) Die oben angegebenen Stämme sind SG200-Derivate (a1:mfa2 bE1 bW2). Sie wurden auf PD-Aktivkohle-Festmedium getropft und für 48 h bei 28°C inkubiert. (B) Sieben Tage alte Maissämlinge wurden mit Mischungen der unten angegebenen Stämme infiziert. Die Symptome wurden 12 Tage nach der Infektion bewertet und in eine der unten angegebenen Kategorie eingeordnet. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Gesamtzahl an infizierten Pflanzen (n) ist über den Balken angegeben.

Um zu überprüfen, ob *mkp2* ebenfalls an der Regulation pathogene Entwicklung beteiligt ist, wurde der entsprechende offene Leserahmen in SG200 deletiert. Die daraus resultierenden Stämme zeigten, im Vergleich zu SG200 keine Unterschiede in Kolonie und Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt). SG200 $\Delta mkp2$ zeigte auf Aktivkohle-haltigen PD-Agarplatten keine Filamentbildung unter diesen Bedingungen (Abb. 29A). Um zu überprüfen, ob dies mit einem Virulenzdefekt einhergeht, wurden die Stämme SG200, SG200 $\Delta rok1$ und SG200 $\Delta mkp2$ in junge Maispflanzen injiziert. Die Auswertung der Symptome 12 Tage nach Infektion ergab, dass *mkp2*-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp ($85,71\% \pm 6,64$) und somit auch zum hypervirulenten $\Delta rok1$ -Stamm ($90,65\% \pm 5,39$) eine reduzierte Virulenz zeigten ($68,85\% \pm 7,59$; Abb. 29B). Im

Vergleich zu *rok1* hat die Deletion von *mkp2* somit entgegengesetzte Auswirkungen auf die Filamentation und Pathogenität von *U. maydis*. Somit erscheint eine negative Regulation von Kpp2 bzw. Kpp6 durch Mkp2 unwahrscheinlich.

3 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden zwei potentielle Msg5p-homologe Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität, Rok1 und Mkp2, in *Ustilago maydis* untersucht. *rok1* zeigt im Gegensatz zu *mkp2* eine Pheromon-induzierte Expression, während die *mkp2*-mRNA-Menge cAMP-induziert ist. Die Deletion von *rok1* führt zu Filamentation haploider Stämme unabhängig von externen Stimuli. Es konnte ferner gezeigt werden, dass *rok1* ein zentraler negativer Regulator der transkriptionellen und der morphologischen Pheromonantwort ist. Die Überexpression von *rok1* inhibiert die Kreuzung kompatibler Stämme, die Bildung von Konjugationshyphen und sowohl die basale als auch die Pheromon-induzierte Expression des *mfal*-Gens. Epistasis-Analysen erlaubten die Einordnung von *rok1* unterhalb der Pheromon-MAPK-Kinase Fuz7. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Rok1 die Phosphorylierung der beiden partiell redundant agierenden MAPK Kpp2 und Kpp6 negativ reguliert. Konsistent mit dem gefundenen negativen Einfluss auf die MAPK Kpp2 und Kpp6 Phosphorylierung, attenuiert *rok1* die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Während die Deletion von *rok1* in axenischer Kultur Filamentations-, Kreuzungs- und Pheromongenexpressionsdefekt von *kpp2*-Mutanten nicht supprimiert, konnte in Infektionsstudien gezeigt werden, dass *rok1* einen Suppressor der Pathogenitätsdefekte von $\Delta kpp2$ - und *kpp6AEF*-Mutanten darstellt. Untersuchungen der initialen Infektionsprozesse ergaben, dass die Deletion von *rok1* zu einer erhöhten Appressorienbildung auf der Blattoberfläche und zu einer effizienteren Kolonialisierung der Pflanze durch *U. maydis* führt. Rok1 reguliert somit negativ die sexuelle und pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Im Gegensatz dazu, zeigten *mkp2*-Deletionsmutanten einen Verlust der Filamentation auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten und eine reduzierte Pathogenität, was einen zu $\Delta rok1$ -Stämmen gegensätzlichen Phänotyp darstellt.

3.1 Rok 1 fällt in die Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität die pilzliche MAPK-Signalwege regulieren

Die in dieser Arbeit identifizierten Phosphatasen, Rok1 und Mkp2, gehören zur Klasse der Protein-Tyrosin-Phosphatasen dualer Spezifität (DSP). In *U. maydis* existieren nach Sequenzanalyse insgesamt 3 DSPs, wobei Rok1 und Mkp2 eine mit 23,6% respektive 22,9% Identität ähnlich hohe Sequenzidentität zur DSP Msg5p aus *S. cerevisiae*. Weiter Cpp1 aus *C. albicans* und Pmp1 aus *S. pombe* besitzen. Diese DSP sind an der Regulation der sexuellen Entwicklung und Pheromonantwort in den jeweiligen Pilzen beteiligt. Mit einer Länge von 1070 Aminosäuren ist Rok1 um 490 Aminosäuren länger als die nächst kleinere DSP, Msg5p aus *S. cerevisiae*. Der Sequenzvergleich zeigte, dass sich die Sequenzähnlichkeiten aller gezeigten Phosphatasen auf die DSP-Domänen beschränken (Abb. 7C). Der Sequenzabgleich des katalytischen Bereichs dieser Domänen zeigte, dass sowohl Rok1 als auch Mkp2 die für die DSP-Aktivität essentiellen Histidin-, Cystein- und Argenin-Reste besitzen (Abb. 7B). Die DSP-Domäne von Rok1 scheint durch einzelne Sequenzbereiche ohne Ähnlichkeit zu den DSP-Domänen der anderen Phosphatasen unterbrochen zu sein (Abb. 7C). Des Weiteren beinhaltet dieser Bereich eine der drei PEST-Sequenzen von Rok1. Neben Rok1 konnte nur in Msg5p und Cpp1 PEST-Sequenzen identifiziert werden. Im C-Terminus von Rok1 konnten weitere PEST-Sequenzen identifiziert werden. PEST-Sequenzen sind Bereiche, die die Proteinstabilität von Proteinen negativ beeinflussen (Rogers *et al.*, 1986). Der C-Terminus von Rok1 könnte in Kombination mit der PEST-Sequenz in der DSP-Domäne über die Regulation der Proteinstabilität an der Kontrolle der Rok1-Aktivität beteiligt sein. Rok1 besitzt in den an die DSP-Domäne angrenzenden N- und C-terminalen Extension potentielle MAPK-Interaktionssequenzen (D-Boxen) und zusätzlich Regionen mit erhöhter Häufigkeit bestimmter Aminosäuren (eine Serin-reiche im C-terminalen Bereich und eine Prolin-reiche im N-Terminus; (Abb. 7C). Die D-Boxen vermitteln die Interaktion von Proteinen mit MAPK (Jacobs *et al.*, 1999). Da Rok1 die beiden MAPK Kpp2 und Kpp6 reguliert, wäre es denkbar, dass die D-Boxen die Interaktion zwischen Rok1 und den Ziel-MAPK Kpp2 und Kpp6 vermitteln. Im N-Terminus wurden zwei potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen identifiziert (Abb. 7C). In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die DSP MKP-1 durch die p42/p44-MAPK posttranslational reguliert wird. MKP-1 wird an zwei Serinresten durch die MAPK phosphoryliert, was zu einer Stabilisierung der

Phosphatase führt (Brondello *et al.*, 1999). Somit könnten die putativen MAPK-Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von Rok1 ebenfalls an einer posttranslationalen Regulation der Phosphatase beteiligt sein.

3.2 *rok1* kontrolliert die Filamentation von *U. maydis* über die Balance zwischen aktivem cAMP- und aktivem MAPK-Signalweg

Die Untersuchung der *rok1*-Deletions- und Überexpressionsstämmen hat gezeigt, dass *rok1* die Ausbildung von Filamenten inhibiert. Des Weiteren führt die Deletion von *rok1* zur Filamentation von *U. maydis*, ohne dass es eines zusätzlichen Stimulus bedarf. Es stellt sich die Frage, welcher Natur die durch *rok1*-Deletion hervorgerufenen Filamente sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *rok1* den Phosphorylierungsstatus von Kpp2 negativ reguliert. Die Überexpression von *rok1* führt darüber hinaus zur Inhibition der Konjugationshyphenbildung sowie zur Inhibition Fuz7DD induzierter Filamente. Rok1 inhibiert also die MAPK-Phosphorylierung und agiert unterhalb der MAPKK Fuz7. Die Filamentation von *rok1*-Deletionsstämmen könnte also durch eine erhöhte Basalaktivität des Kpp2-MAPK-Moduls erklärt werden. Allerdings konnte in Westernanalysen von Proteinextrakten aus *rok1*-Deletionsstämmen ohne Pheromonstimulus keine detektierbare Phosphorylierung von Kpp2 nachgewiesen werden. Da diese Analysen mit Flüssigkulturen deren OD₆₀₀ nicht über 1 lag durchgeführt wurden, die Filamentation von haploiden $\Delta rok1$ -Zellen jedoch erst nach ca. 24 bis 48 Stunden Inkubation beobachtet werden kann, könnte dies darauf hindeuten, dass es in $\Delta rok1$ -Stämmen erst zu einer Akkumulation an phosphoryliertem Kpp2 kommen muss, um die Filamentation der Zelle zu initiieren. Der Umstand, dass $\Delta rok1$ -Filamente, wie Konjugationshyphen, *kpp2*-abhängig sind, ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei *rok1*-Hyphen um eine Kpp2 regulierte Morphogenese handelt. Die ausgebildeten Filamente sind jedoch nicht fusionskompetent, wie die Experimente mit FB1-FB6b Kreuzungen zeigten. Eine ähnliche Situation herrscht in *C. albicans* vor, wo das hyperfilamentöse Wachstum von *CPPI*-Deletionsmutanten von der Anwesenheit des *CEK1*-MAPK-Gens abhängig ist. In diesem humanpathogenen Pilz konnte gezeigt werden, dass die *CPP1*-MAPK-Phosphatase die *CEK1*-MAPK inhibiert (Csank *et al.*, 1997; 1998). Hieraus resultiert auch die inhibierende Wirkung auf das filamentöse Wachstum von entsprechenden *C. albicans* Mutanten (Csank *et al.*, 1997;

1998; Biswas *et al.*, 2007). Somit handelt es sich bei $\Delta rok1$ -induzierten Filamenten wahrscheinlich um Hyphen, die durch eine Akkumulation an aktiviertem Kpp2-Protein hervorgerufen werden.

Die durch die Deletion von *rok1* hervorgerufenen Filamente stellen somit wahrscheinlich MAPK-induzierte Filamente dar, die durch eine Erhöhung der basalen Kpp2-Aktivität hervorgerufen werden. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass die Filamentation von FB1 $\Delta rok1$ durch die Zugabe exogenen cAMPs inhibiert werden kann. Es ist bekannt, dass die Inaktivierung des cAMP-Signalweges durch Deletion der Adenylatzyclasegens *uac1* oder des Gens der katalytischen Untereinheit der PKA, *adr1*, zur Filamentation von *U. maydis* führt (Gold *et al.*, 1994; Dürrenberger *et al.*, 1998). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass der cAMP-Signalweg und das MAPK-Modul antagonistisch auf die morphologische Pheromonantwort wirken (Müller, 2003). Außerdem führt die Zugabe von cAMP zur Inhibition der Ausbildung Fuz7DD-induzierter Hyphen (Daten nicht gezeigt; T. Brefort, pers. Mitteilung). In *U. maydis* führt also sowohl die Aktivierung des MAPK-Moduls, als auch die Inaktivierung des cAMP-Weges zur Induktion hyphalen Wachstums. Umgekehrt inhibiert die Aktivierung des cAMP-Weges den MAPK-induzierten Filamentationsprozess. Dies deutet an, dass die Ausbildung von Hyphen durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Aktivierung des cAMP-Signalweges und des Kpp2-MAPK-Moduls reguliert wird. Die Deletion von *rok1* könnte also durch die hieraus resultierende leicht erhöhte Basalaktivität der Kpp2-MAPK, dieses empfindliche Gleichgewicht in Richtung der MAPK-induzierten Filamentation verschieben. *rok1* spielt somit bei der Regulation dieses Gleichgewichtes eine zentrale Rolle. Bezüglich der Frage, auf welcher Ebene diese Interaktion zwischen den beiden Signalwegen stattfindet, wäre es denkbar, dass der cAMP-Signalweg direkt auf das MAPK-Modul wirkt. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss eines aktiven cAMP-Signalweges auf die Zellmorphologie unterhalb von Kpp2 stattfindet (Müller, 2003). Somit erscheint eine zweite Möglichkeit, in der das MAPK-Modul und der cAMP-Signalweg antagonistisch auf einen gemeinsamen Zielfaktor wirken, als die wahrscheinlichere. Die MAPK Crk1 wäre ein Kandidat für einen solchen Faktor.

3.3 Rok1, ein zentraler negativer Regulator des Pheromon- und Pathogenitäts-MAPK-Moduls in *U. maydis*

In Westernanalysen zum Nachweis von Phosphorylierung von MAPKs zeigte der *rok1*-Deletionsstamm, anders als der Wildtypstamm, neben Kpp2 und Kpp6, eine weitere phosphorylierte MAPK. Die Größe der detektierten Bande entspricht einer Slt2p-homologen MAPK (50,5 kDa; Um10107). Somit scheint *rok1* neben Kpp2 und Kpp6 auch die Phosphorylierung des Slt2p-Homologs Um10107 zu regulieren. In der Bäckerhefe reguliert die DSP Msg5p neben Fus3p auch die MAPK des Zellintegritäts-Signalweges, Slt2p (Martín *et al.*, 2000; Flández *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993). Entsprechend führt die Deletion von Msg5p in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zellwandstress verursachenden Agenzien (Flandez *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigt sich in *U. maydis* nur bei einer Überexpression von *rok1* ein Zellwandstress assoziierter Phänotyp, d. h. eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Congorot. Damit ist es also wahrscheinlich, dass Rok1 neben Kpp2 und Kpp6 auch die Aktivität der Slt2p-homologen MAPK Um10107 reguliert. Allerdings wurde bei Deletion des *SLT2*-homologen Gens, *um10107*, keine erhöhte Sensitivität gegenüber Congorot festgestellt (J. Perez-Martin, pers. Mitteilung), d. h. ein Einfluss dieses Gens *um10107* liegt möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze.

Northern Analysen ergaben dass *rok1* sowohl die basale als auch die Pheromon-induzierte Expression der Gene im *a*-Locus reprimiert. Des Weiteren zeigten *rok1*-Überexpressionsstämme keine Konjugationshyphenbildung und wiesen eine stark attenuiertes Kreuzungsverhalten in Tropftests mit kompatiblen Stämmen auf. Bei Deletion von *rok1* in den solopathogenen SG200 und CL13-Stämmen kam es zu einer erhöhten Expression des *bE*-Gens. Der im Tropftest beobachtete, im Vergleich zu SG200 geringere Koloniedurchmesser von SG200 Δ *rok1* könnte ein Indiz für einen effizienteren *b*-abhängigen Zellzyklusarrest sein (Flor-Parra *et al.*, 2006). Dies ist möglicherweise eine direkte Folge der erhöhten *b*-Expression in Δ *rok1*-Stämmen. Da auch die *b*-Genexpression von dem Kpp2-MAPK-Modul reguliert wird, ist auch diese Beobachtung konform mit einer erhöhten Aktivität dieses Moduls in Δ *rok1*-Stämmen. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Deletion von *rok1* in CL13 zu Filamentation und Virulenz führt, die vergleichbar mit der des SG200-Stamms ist. Dies zeigt, dass die durch *rok1*-Deletion verursachte, erhöhte Aktivität des Pheromon-MAPK Moduls ausreichend ist, um die fehlende Aktivierung durch kompatibles Pheromon in CL13 zu ersetzen. Somit kann

die Pheromonantwort durch Deletion von *rok1* intrinsisch aktiviert werden. Die Deletion von *rok1* erlaubt somit die gezielte genetische Aktivierung des Pheromon-MAPK-Moduls und stellt somit ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung der Pheromon-MAPK-Signaltransduktion in *U. maydis* dar.

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* reguliert die DSP Msg5p die adaptive Pheromonantwort (Doi *et al.*, 1994). Für *U. maydis* konnte eine solche adaptive Antwort bisher nicht gezeigt werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen eine transiente Phosphorylierung der MAPK Kpp2 nach der Stimulation durch kompatibles Pheromon. Dies deutet auf eine Adaption des Pheromon-MAPK-Moduls an einen andauernden Pheromonstimulus hin. Ein möglicher Mechanismus dieser Adaption könnte, analog zur Situation in *S. cerevisiae*, die Regulation der Kpp2-MAPK-Aktivität über die Dephosphorylierung durch Rok1 sein. In *rok1*-Deletionsmutanten war zwar eine Verstärkung des Phosphorylierungssignals zu beobachten, jedoch trat auch hier eine Reduktion des Signals nach 90 Minuten Inkubation mit Pheromon ein. Hiernach wäre *rok1* zwar an der Regulation der Magnitude der Kpp2/Kpp6-Aktivierung, nicht aber an der Aktivierungsdauer, beteiligt. Die Aktivierungsdauer könnte durch weitere Phosphatasen oder andere Mechanismen reguliert werden, was unter 3.4. diskutiert wird.

Neben Kpp2 und Kpp6 ist die MAPK Crk1 Teil des beschriebenen MAPK-Modul (Garrido *et al.*, 2004). Auch Crk1 besitzt das TEY-Motiv, an dem die Phosphorylierung durch die dual spezifische MAPKK Fuz7 erfolgt (Garrido *et al.*, 2004). Es wäre also denkbar, dass Rok1 zusätzlich die MAPK Crk1 reguliert. Die MAPK-Phosphorylierung von Crk1 konnte in Westernanalysen nicht nachgewiesen werden, weder in Wildtyp- noch in $\Delta rok1$ -Stämmen. Crk1 agiert im Hinblick auf die transkriptionelle Pheromonantwort parallel zu Kpp2. Für die Crk1-abhängige Filamentation ist jedoch die Phosphorylierung durch Kpp2 nötig, sodass mit Blick auf die Filamentation Crk1 unterhalb von Kpp2 eingeordnet wurde (Garrido *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass die Deletion von *crk1* die Filamentation der $\Delta rok1$ -Stämme nur partiell supprimiert (Di Stasio *et al.*, 2009), während die Deletion von *kpp2* zu einer kompletten Suppression führt, unterstützt die Annahme, dass Crk1 in der Filamentation unterhalb von Kpp2 agiert und deutet darauf hin, dass Kpp2 neben Crk1 noch weitere Effektoren der Filamentation kontrolliert. Außerdem ist dies ein Indiz dafür, dass *rok1* zwar Kpp2 aber nicht die Aktivität von Crk1 direkt reguliert.

In der Analyse der MAPK-Phosphorylierung konnte zusätzlich der inhibitorische Einfluss von *rok1* auf die Phosphorylierung einer zweiten MAPK gezeigt werden, bei der es sich höchstwahrscheinlich um Kpp6 handelt. Beide MAPKs, Kpp2 und Kpp6 sind zentrale

Regulatoren der sexuellen und pathogenen Entwicklung von *U. maydis* und haben während dieser Entwicklungsschritte partiell redundante Funktionen (Müller *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2003; Brachmann *et al.*, 2003). Insbesondere zeigen sich diese redundanten Funktionen in der noch vorhandenen jedoch stark reduzierten Pathogenität von *kpp2* und *kpp6* Einzelmутanten, während Doppelmутanten apathogen sind (Müller *et al.*, 2003; Brachmann *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Deletion von *rok1* die Pathogenitäts-assoziierten Phänotypen der *kpp2*- und *kpp6*-Einzelmутanten teilweise supprimiert. Zu erklären ist dies durch die gesteigerte Aktivierung der jeweils verbleibenden MAPK, hervorgerufen durch die Deletion der Phosphatase. Eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Kpp2 scheint in der Lage zu sein, den Verlust der Kpp6-MAPK zu kompensieren. Umgekehrt kann auch die gesteigerte Phosphorylierung von Kpp6 den Ausfall der Kpp2-MAPK in der pathogenen Entwicklung teilweise ausgleichen. Dies gilt jedoch nur für die pathogene Entwicklung von solopathogenen Stämmen. Für den Verlust der Paarungskompetenz von *kpp2*-Deletionsmutanten konnte keine Suppression durch Deletion von *rok1* beobachtet werden. Ebenso reagierten $\Delta kpp2 \Delta rok1$ -Doppelmутanten auf den Pheromonstimulus nicht mit der Ausbildung von Konjugationshyphen. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die *kpp2*-abhängige Expression von Kpp6: Es konnte gezeigt werden, dass Kpp6 nur dann exprimiert wird, wenn *kpp2* vorliegt (Zarnack *et al.*, 2008). Das Fehlen des Kpp6-Proteins könnte somit die Suppression des $\Delta kpp2$ -Filamentations- und Kreuzungsdefekts bei Deletion von *rok1* verhindern. Jedoch wurde in einem anderen Experiment demonstriert, dass Kpp6 nach Pheromonstimulation auch in $\Delta kpp2$ -Stämmen phosphoryliert vorliegt, wenn *rok1* fehlt (Di Stasio *et al.*, 2009). Somit ist in $\Delta kpp2 \Delta rok1$ Kpp6-Protein vorhanden und liegt zumindest phosphoryliert vor. Folglich erscheint es unwahrscheinlich, dass Kpp6 in Konjugationshyphenbildung und Zellfusion von *U. maydis* die Funktion von Kpp2 auch nur partiell übernehmen kann. Vielmehr wird durch diese Ergebnisse die essentielle Rolle der Kpp2-MAPK in diesen Prozessen weiter unterstrichen. Die Funktion von Kpp6 kann auch durch Kpp2 nicht vollständig übernommen zu werden, denn auch in *kpp6AEF*-Mutanten führt die *rok1*-Deletion nicht zur vollständigen Suppression des Pathogenitätsdefekts. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die beiden MAPK, Kpp2 und Kpp6, neben ihren partiell redundanten Funktionen in der Pathogenese, spezifische Aufgaben besitzen, die von der jeweils anderen MAPK nicht übernommen werden.

Die durch *rok1*-Deletion hervorgerufene Aktivierung des Pheromon-MAPK-Moduls führte jedoch nicht zu einer pheromonunabhängigen Fusion von Stämmen, die kompatible

b-Loci aber gleiche *a*-Loci besitzen. Es ist bekannt, dass Hyphen, die durch die Expression der konstitutiv aktiven MAPKK Fuz7 induziert werden, ebenfalls nicht in der Lage sind, unabhängig von einem kompatiblen Kreuzungspartner zu fusionieren (P. Müller, persönliche Mitteilung). Somit scheint die intrinsische Aktivierung des MAPK Moduls nicht hinreichend, um eine Fusion von Zellen hervorzurufen. Die Konjugationshyphen von *U. maydis* wachsen gerichtet auf die Pheromonquelle zu und fusionieren an ihren Spitzen (Snetselaar *et al.*, 1996). Hierbei handelt sich um eine Polarisation der Zelle als Reaktion auf den Pheromonstimulus. Auch in *S. cerevisiae* führt die Perzeption eines Pheromonsignals zur Polarisation der Zelle und zur Ausbildung der „shmoos“. Hierbei spielt die polarisierte Endozytose von Ste6p, des ABC-Transporter für den Export des *a*-Faktors, eine zentrale Rolle. Diese polarisierte Endozytose dieses Membranproteins ist essentiell für die Zell-Zell-Fusion (Elia und Marsh, 1996; Kelm *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2005). Auch für *U. maydis* wurde diskutiert, dass die polarisierte Exo- bzw. Endozytose des Pra-Rezeptors, eine essentielle Rolle für die Polarisation der Zelle während der Paarung bzw. Fusion kompatibler Zellen spielt (Fuchs *et al.*, 2006). Die entscheidende Frage an dieser Stelle ist, welche intrazellulären Mechanismen die Pheromon-induzierte Polarisation und Fusionskompetenz der Zellen steuern. In Hefe wird u. a. die Verteilung der aktivierten (doppelt-phosphorylierten) MAPK Fus3p, als Polarisationsfaktor für die gerichtete Bildung der sogenannten „shmoos“ diskutiert (Maeder *et al.*, 2007). Die DSP Msg5p übernimmt eine zentrale Rolle bei der Etablierung dieses vom perzipierenden Zellpol ausgehenden Gradienten an doppelt-phosphorylierter MAPK Fus3p (Maeder *et al.*, 2007). Dieser Gradient könnte somit einer der Hauptfaktoren der Zellpolarisation zur Vorbereitung der Zell-Fusion sein. Die höchste Konzentration an aktivierter MAPK ist an dem Zellpol zu erwarten, an dem die Zelle der höchsten Konzentration an Pheromon ausgesetzt ist, also dem Pol, der der Pheromonquelle am nächsten liegt. Überträgt man diese Erkenntnisse auf *U. maydis*, würde die genetische Aktivierung des MAPK-Moduls durch die Expression der konstitutiv aktiven MAPK Kinase bzw. die Deletion des MAPK-Phosphatasegens *rok1* dazu führen, dass kein intrazellulärer Gradient aktiver Kpp2-MAPK aufgebaut wird. Die Zelle wäre somit nicht in der Lage festzustellen, wo sich die Pheromonquelle befindet. Damit wäre eine gerichtete Exo- bzw. Endozytose entscheidender Zellfusions-Faktoren nicht möglich. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass weder die Expression des *fuz7DD*-Allels noch die Deletion von *rok1* zu einer *a*-unabhängigen Fusion von *U. maydis* Zellen führt.

3.4 Weitere Regulatoren der Pheromon-MAPK Kpp2 und Kpp6

Die Westernanalysen zur MAPK-Phosphorylierung ergaben, dass in *Δrok1*-Stämmen der Grad der Phosphorylierung von Kpp2 und Kpp6 stark erhöht ist. Allerdings war auch in *rok1*-Deletionsmutanten nur eine transiente Phosphorylierung dieser beiden MAPKs zu detektieren, d.h. nach 90 minütiger Stimulation mit Pheromon war keine phosphorylierte Kpp2- und Kpp6-MAPK mehr detektierbar. Dies ist ein Indiz das Vorliegen weiterer posttranslationaler Regulatoren von Kpp2 und Kpp6. In *S. cerevisiae* wird die MAPK Fus3p außer durch Msg5p, noch durch die beiden Protein-Tyrosin-Phosphatasen Ptp2p und Ptp3p dephosphoryliert. Ptp3p reguliert in Kooperation mit Msg5p den Phosphorylierungsstatus von Fus3p (Zahn *et al.*, 1997). Im *U. maydis* Genom konnte ein PTP3-homologes Gen (*um10534*) identifiziert werden. Allerdings gelang es nicht, aus mehr als 100 Transformanten, einen Stamm zu isolieren, in denen dieses Gen deletiert war (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von *um10534* in *U. maydis* letal sein könnte. In *S. cerevisiae* reguliert Ptp3p neben Fus3p auch die Hog1p Osmolaritäts-MAPK (Martín *et al.*, 2005). In *U. maydis* scheint die Hog1p-homologe MAPK (Um02357) essentiell zu sein (A. Mendoza-Mendoza, pers. Mitteilung). Dies könnte ein indirekter Hinweis darauf sein, dass Um10534 und Um02357 in *U. maydis*, analog zu Hog1p und Ptp3p in *S. cerevisiae*, im gleichen Signalweg agieren. Somit könnte Um10534 in *U. maydis*, ebenfalls analog zur Situation in *S. cerevisiae*, an der Regulation der Pheromon-MAPK Kpp2 und Kpp6 beteiligt sein. Um eine mögliche Funktion von *um10534* im Pheromon-MAPK-Signalweg zu überprüfen, könnten konditionale Mutanten generiert werden.

Neben der Regulation durch weitere Phosphatasen wäre die in Abwesenheit von Rok1 beobachtete Transienz der Phosphorylierung von Kpp2 auch durch andersartige Mechanismen erklärbar. Betrachtet man parallel die Mengen an Kpp2-Protein, so fällt auf, dass nach 90 minütiger Pheromonstimulation kaum noch Kpp2-Protein nachweisbar ist. Dies könnte andeuten, dass die Akkumulation aktiven Kpp2 neben der Inaktivierung durch Phosphatasen durch proteolytischen Abbau gewährleistet wird. Bisher scheint kein solcher Mechanismus für MAPK bekannt zu sein. Jedoch sind vergleichbare Mechanismen für Komponenten des Pheromon-Signalwegs der Bäckerhefe beschrieben. So konnte in *S.*

cerevisiae eine Fus3-abhängige Pheromon-induzierte Degradation des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors Ste12p, einem zentralen Regulator der Pheromonantwort, gezeigt werden (Esch *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde in *S. cerevisiae* nach Pheromonstimulation eine SCF-vermittelte Polyubiquitinierung der Pheromon-MAPKK Ste7 mit daraus resultierendem erhöhten Abbau beobachtet (Wang und Dohlman, 2002; Wang *et al.*, 2003). Auch die Pheromon-MAPKKK der Bäckerhefe, Ste11p, unterliegt einem ähnlichen Mechanismus: Ste11p wird nach Pheromonstimulation ubiquitiniert und führt ebenfalls zu verstärkter Degradation (Esch und Errede, 2002). Entsprechend wäre auch in *U. maydis* ein proteolytischer Abbau von aktivierter Kpp2-MAPK vorstellbar. Dies würde die beobachtete Transienz der Kpp2-Phosphorylierung in $\Delta rok1$ -Stämmen erklären. Ein weiterer Hinweis für einen solchen Mechanismus liefert die Beobachtung, dass nach Aktivierung des MAPK-Moduls durch Expression des *fuz7DD*-Allels, zwar die Menge an phosphorylierter MAPK Kpp6 zunimmt, die Kpp6-Gesamtproteinmenge gleichzeitig jedoch abnimmt (Di Stasio *et al.*, 2009). Neben der Dephosphorylierung der aktivierten MAPK Kpp2 und Kpp6 durch Phosphatasen könnte in *U. maydis* also zusätzlich der spezifische proteolytische Abbau phosphorylierter MAPK zur Attenuation der Signaltransduktion beitragen und so die Zellen vor schädlicher, dauerhafter Überaktivierung des Pheromon-MAPK-Moduls bewahren.

In den Lokalisationsstudien zeigte sich, dass Rok1 ohne Pheromonstimulus an der Zellmembran lokalisiert, während Kpp2 im Zytoplasma verteilt vorlag und eine leichte Akkumulation im Zellkern zeigte. Nach Stimulation mit Pheromon stieg der Anteil an Kpp2 im Zellkern. Dies bestätigt die bereits beobachtete Translokation von Kpp2 nach Stimulation mit Pheromon (Müller, 2003). Auch Rok1 zeigte eine Translokation nach Pheromonstimulation. Nach 90 minütiger Stimulation lokalisiert Rok1 an filamentösen Strukturen entlang der Konjugationshyphen und um den Zellkern herum. Weder stimuliert, noch unstimuliert war Rok1 im Zellkern zu beobachten. Dies erinnert an Beobachtungen in *S. cerevisiae*. In der Bäckerhefe scheint es einen Mechanismus zu geben, der sicherstellt, dass Msg5p nicht im Zellkern lokalisiert (Maeder *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu *U. maydis* ist die Verteilung von Msg5p im Zytoplasma jedoch gleichmäßig und unabhängig von der Stimulation mit Pheromon (Maeder *et al.* 2007). Diese zytoplasmatische Verteilung von Msg5p ist wahrscheinlich für die Generierung eines Gradienten an aktiver MAPK Fus3p verantwortlich. Dieser Gradient zeigt an der Spitze der „shmoos“ die höchste Fus3p-Aktivität, die zum Zellkern hin abnimmt (Maeder *et al.* 2007). Anders als Msg5p zeigt

Rok1 eine Stimulus-abhängige Translokation von der Zellmembran hin zu Strukturen, die ER darstellen könnten.

In nicht stimulierten Zellen lokalisiert Rok1 vorwiegend an der Zellmembran. Eine zusätzliche Akkumulation zeigt sich an den Septin-Strukturen zwischen Tochter- und Mutterzellen, wobei der Eindruck entsteht, dass diese Akkumulation vorwiegend auf Seiten der Tochterzelle vorliegt. Eine solche Anreicherung an Septen ist für Faktoren bekannt, die die Zytokinese von *U. maydis* regulieren. Cdc42 zeigt eine Akkumulation an der Zellmembran, den Vakuolen und an den Septen von Tochter- und Mutterzelle (Böhmer *et al.*, 2007). Es bestünde also auch die Möglichkeit, dass Rok1 zusätzlich an der Zytokinese beteiligt ist. Dagegen spricht jedoch, dass kein damit assoziierter Phänotyp, d. h. Zytokinesedefekt, in *rok1*-Mutanten erkennbar war. Somit ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar, wie die Lokalisierung von Rok1 zu erklären ist und es bedarf weiterer Untersuchungen.

3.5 Rok1 reguliert neben Filamentation auch die Appressorienbildung und die Kolonisierung der Wirtspflanze

Die Deletion der DSP *rok1* führt zur einer drastisch erhöhten Virulenz von *U. maydis* Stämmen. Auch die solopathogenen $\Delta rok1$ -Stämme zeigten eine erhöhte Pathogenität. Da diese Stämme zur erfolgreichen Infektion von Mais nicht auf die Fusion mit einem kompatiblen Kreuzungspartner angewiesen sind, zeigt dies den Einfluss von *rok1* auf postfusionale Prozesse. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rok1 die Filamentation und Ausbildung von Infektionsstrukturen entscheidend reguliert. Sowohl die Filamentation als auch die Bildung und Funktion von Appressorien werden maßgeblich durch das MAPK-Modul mit den beiden MAPK Kpp2 und Kpp6 reguliert (Müller *et al.*, 1999; Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003; Müller 2003). Somit wäre die Hyperaktivierung dieses Moduls durch die Deletion von *rok1* eine Erklärung für die Hypervirulenz der solopathogenen $\Delta rok1$ -Stämme. Folglich werden vermutlich auch Prozesse nach der Appressorienbildung durch *rok1* maßgeblich mitreguliert. Einen Hinweis hierauf liefert die gesteigerte Phosphorylierung der MAPK Kpp6 in *rok1*-Deletionsstämmen. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Kpp6 eine Voraussetzung für

die Penetration der pflanzlichen Cuticula ist (Brachmann *et al.*, 2003). Mutanten, die eine nicht phosphorylierbare Variante von Kpp6, Kpp6AEF, tragen, können noch Infektionsstrukturen bilden, sind jedoch nicht in der Lage die Blattoberfläche zu penetrieren (Brachmann *et al.*, 2003). Im Umkehrschluss könnte die erhöhte Aktivierung von Kpp6 in *rok1*-Deletionsmutanten zu einer erhöhten Penetrationseffizienz der Appressorien führen. Diesem Szenario entsprechend konnte in dieser Arbeit eine im Vergleich zu SG200 deutlich verstärkte Kolonialisierung der Wirtspflanze durch SG200 Δ rok1 nachgewiesen werden. Eine Differenzierung zwischen den Einflüssen der erhöhten Filamentation, der effizienteren Appressorienbildung und einer erhöhten Penetrationseffizienz der Appressorien ist damit jedoch nicht möglich. Auf Grund der gesteigerten Kpp6-Phosphorylierung, liegt jedoch die Vermutung nahe, dass *rok1* auch die Penetration selbst reguliert.

Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass *rok1* auch auf spätere Prozesse der weiteren biotrophen Entwicklung wirkt und hierüber zusätzlich zur beobachteten Hypervirulenz von Δ rok1-Mutanten beiträgt. Dies könnte entweder ebenfalls durch Hyperaktivierung des Kpp2/Kpp6-MAPK-Moduls oder durch die Deregulation weiterer bisher nicht identifizierter Zielproteine in *rok1*-Deletionsmutanten erklärt werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass *U. maydis* auch während des Wachstums in der Pflanze beim Übergang zwischen zwei Pflanzenzellen möglicherweise Appressorien-ähnliche Strukturen ausbildet (Döhlemann *et al.*, 2009). Sollte es sich hierbei tatsächlich um Appressorien handeln, liegt die Vermutung nahe, dass diese Strukturen von den gleichen Faktoren reguliert werden, die auch die Appressorien Differenzierung auf der Pflanzenoberfläche steuern, sprich Kpp2 und Kpp6. Eine Beteiligung von *rok1* an der Ausbreitung und Proliferation in der Pflanze erscheint somit wahrscheinlich. Hier könnte auch eine Erklärung für die beobachtete erhöhte Anzahl an Pflanzen mit großen Tumoren liegen. Eine solche gesteigerte Kolonisierung könnte auch zum Absterben der Wirtspflanze führen und so die große Anzahl an toten Pflanzen nach Infektion mit Δ rok1-Stämmen erklären. Somit wäre *rok1* nicht nur maßgeblich an der Regulation von Prozessen auf der Blattoberfläche sondern auch an Regulation der nachfolgenden biotrophen Entwicklungen beteiligt.

Mit der Charakterisierung von Rok1 eröffnen sich ferner neue Möglichkeiten für Epistasis-Analysen und genetische Screens auf Faktoren des Kpp2/Kpp6-MAPK-Signalweges. Anders als bei Expression des *fuz7DD* Allels, ist es bei *rok1* nicht nötig Konditionalmutanten zu generieren, um den Signalweg genetisch aktivieren zu können.

Hierdurch wird auch eine Charakterisierung von Faktoren des Signalweges auf und in der Pflanze möglich.

3.6 Rok1 reguliert die Integration spezifischer Differenzierungssignale

In *U. maydis* kann die Appressorienbildung durch eine Kombination aus hydrophober Oberfläche und 16-Hydroxyhexadecansäure *in vitro* stimuliert werden, hierbei wird der hydrophoben Oberfläche die zentrale Rolle zugeschrieben und der Hydroxyfettsäure eine stimulierende (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2008). *rok1*-Deletionsstämme zeigen nach *in vitro* Induktion der Appressorienbildung bereits ohne Fettsäurestimulus eine effektive Ausbildung der Infektionsstrukturen. Somit ist der Fettsäurestimulus in Abwesenheit von Rok1 nicht mehr zu effizienten Appressorienbildung nötig. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Integration des Fettsäurestimulus über die Aktivierung des Kpp2/Kpp6-MAPK-Moduls erfolgt. Durch die Aktivierung dieses MAPK-Moduls in *rok1*-Deletionsstämmen kommt es dann zur Entkopplung von Fettsäuresignal und der entsprechenden physiologischen Antwort, der Appressorienbildung. In anderen Modellsystemen gibt es Hinweise darauf, dass die exakte Kontrolle von Dauer und Magnitude der Phosphorylierung von MAPK die spezifische zelluläre Antwort auf ein Signal gewährleistet (Marshall, 1995). Für *S. cerevisiae* wird entsprechend diskutiert, dass Magnitude und Dauer von MAPK-Phosphorylierung die Spezifität von Signalwegen entscheidend bestimmen (Sabbagh *et al.*, 2001). Hierdurch könnte die Integration verschiedener Signale zu verschiedenen physiologischen Antworten über teilweise gemeinsam Signaltransduktionskomponenten gewährleistet werden (Sabbagh *et al.*, 2001). Entsprechend könnte in *U. maydis* Rok1 die jeweils richtige zelluläre Antwort als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie Pheromon, hydrophobe Oberfläche und Fettsäure, steuern. Analog zur Situation in *S. cerevisiae* könnte dies über die Regulation der Phosphorylierungsmagnitude der MAPKs Kpp2 und Kpp6 erfolgen. Die Regulation der Integration spezifischer Signale könnte auch eine Erklärung für die Existenz von *rok1* in *U. maydis* liefern. Die *rok1*-Deletionsmutante sind nicht in der Lage zwischen Blattoberfläche der Wirtspflanze oder auf irgendeiner hydrophoben Oberfläche zu unterscheiden. Die Zelle könnte also auf jeder hydrophoben Oberfläche mit der Initiation des „Infektionsprogramms“ beginnen, was in einer „Sackgasse“ enden würde.

3.7 Die dual spezifische Phosphatase, Mkp2, beeinflusst Filamentation und pathogene Entwicklung

Trotz einer ähnlich hohen Homologie der beiden MAPK-Phosphatasen Rok1 und Mkp2 zu Msg5p zeigen die Deletionsmutanten der jeweiligen Gene konträre Phänotypen. Während die Deletion von *rok1* zur Filamentation und einer erhöhten Pathogenität von *U. maydis* führt, zeigen solopathogene SG200 Stämme nach Deletion von *mkp2* eine stark reduzierte Ausbildung von Filamenten. Auch die pathogene Entwicklung der *mkp2*-Stämme ist gegenüber dem Wildtypstamm reduziert. Es stellt sich die Frage, welche filamentations-assoziierten Prozesse von Mkp2 reguliert werden. Aufgrund der zur Rok1 vergleichbar großen Homologie zu Msg5p wurde zunächst angenommen, dass Mkp2 ebenfalls ein Regulator des Kpp2/Kpp6-MAPK-Moduls sein könnte. Dies erscheint aufgrund des Phänotyps jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Fall ein ähnlicher Phänotyp zu erwarten wäre, wie ihn die *rok1*-Deletionsstämme zeigen. Mkp2 könnte auch MAPKs (negativ) regulieren, deren Aktivierung die Filamentation und die pathogene Entwicklung inhibieren. Bisher ist jedoch keine solche MAPK in *U. maydis* bekannt. Hier könnten Westernanalysen mit Proteinextrakten aus Dmkp2-Stämmen Aufschluss geben. Mittels phosphospezifischer Antikörper könnten im Vergleich mit dem Ausgangsstamm differenziell phosphorylierte MAPK oder auch andere Proteine identifiziert werden.

In der Literatur sind DSPs beschrieben, die die Phosphorylierung anderer Zielproteine kontrollieren (Niwa *et al.*, 2002). Es könnte also sein, dass Mkp2 in *U. maydis* keine MAPK-Phosphatase darstellt. In *Drosophila melanogaster* wurde eine DSP der sogenannten Slingshot Unterfamilie identifiziert, die den Phosphorylierungsstatus von ADF „*actin-depolarizing-factor*“ Cofilin reguliert (Niwa *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass SSH, eine Phosphatase der Slingshot DSP-Familie aus *D. melanogaster*, die Dephosphorylierung von ADF/Cofilin reguliert und hierüber auch die Organisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst (Niwa *et al.*, 2002). ADF/Cofilin katalysiert, abhängig vom Phosphorylierungsstatus, die Depolarisation von Aktin-Filamenten in der Zelle (Calier *et al.*, 1997; Pavlov *et al.*, 2007). Liegt ADF/Cofilin phosphoryliert vor, ist es inaktiv (Morgan *et al.*, 1993). Als Antwort auf diverse Stimuli wird ADF/Cofilin dephosphoryliert, was die Initiation der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zur Folge

hat. Die Reorganisation des F-Aktins spielt im Spitzenwachstum filamentöser Pilze eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in Heath, 1995). Eine solche Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist auch in *U. maydis* eine Voraussetzung für Filamentation und für volle Virulenz (Weber *et al.*, 2003). Mkp2 weist eine Sequenzidentität von 11% zu SSH aus *D. melanogaster* auf. Im Bereich der katalytischen Domäne beträgt die Sequenzidentität zwischen Mkp2 und SSH 29%. Das *U. maydis* Genom kodiert zudem ein Cofilin-homologes Protein (*um04314*; 41% Sequenzidentität zu Cofilin aus *D. melanogaster*). Mkp2 könnte also in *U. maydis*, analog zur Situation in *D. melanogaster*, den Phosphorylierungsstatus von Cofilin regulieren und hierüber die Reorganisation des Aktin-Zytoskelets steuern. Dieses Szenario würde die beobachteten Filamentationsdefekte von *mkp2*-Deletionsmutanten erklären. Der von Mkp2 gezeigte Phänotyp ist also ein Indiz für eine Beteiligung am diskutierten Prozess sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wären jedoch weitere Experimente nötig. So könnte die Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts in $\Delta mkp2$ -Stämmen einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser DSP an der Organisation des Zytoskelets liefern. Untersuchungen bezüglich einer eventuellen Regulation der Phosphorylierung von Um04314 durch *mkp2* könnte weiter Aufschluss über die Funktion von Mkp2 geben. Darüberhinaus könnte in weiteren Experimenten überprüft werden, ob die cAMP-abhängige Induktion von *mkp2* im Zusammenhang mit dem beobachteten Filamentationsdefekt der *mkp2*-Deletionsmutanten steht. Dies könnte z.B. durch die zusätzliche Deletion des Adenylatzyklasegens in diesen Mutanten geschehen, um zu überprüfen ob es zu einer Suppression des Filamentationsdefekts von $\Delta mkp2$ -Stämmen kommt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen; Einzelheiten siehe (Brachmann, 2001).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden:

YEPS_L-Medium modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract
10 g Pepton
10 g Saccharose
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

CM Vollmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974):

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casamino Acids
0,5 g DNA
1 g Yeast Extract
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g (NH₄)₂SO₄
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
8 ml Spurenelement-Lösung (s. unten)
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H₃BO₃
140 mg MnCl₂ x 4 H₂O
400 mg ZnCl₂
40 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
100 mg FeCl₃ x 6 H₂O
40 mg CuSO₄ x 5 H₂O
Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

- 100 mg Thiamin
- 50 mg Riboflavin
- 50 mg Pyridoxin
- 200 mg Kalziumpantothenat
- 500 mg p-Aminobenzoessäure
- 200 mg Nikotinsäure
- 200 mg Cholinchlorid
- 1000 mg myo-Inositol
- Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990):

- a) Top-Agar:
 - 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
 - 1 M Sorbitol
 - in YEPS_L-Medium
- b) Bottom-Agar:
 - wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

- 24 g Potato Dextrose Broth
- 10 g Aktivkohle
- 20 g Bacto-Agar
- mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml), Phleomycin (40 µg/ml). (Im Fall der Selektion mit Phleomycin auf Festmedien muss zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da sonst das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.).

Enzyme

Restriktionsenzyme und T4-DNA Ligase wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen AMV Reverse Transkriptase (Invitrogen), *Taq*- (Laborpräparation), *TaqPlus® Precision*- und *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene).

Verwendete Kits und sonstiges Material

QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, GeneRacer Kit (Invitrogen) zur Herstellung von 5'- und 3'-cDNA aus Gesamt-RNA, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen SIGMA-Genosys und Operon synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

Folgende Oligonukleotide liegen im *rok1*-Locus und wurden zur PCR und Sequenzierung verwendet:

MDS279 seq rok1 Puni1

CGT TCA GTC TGC CAT TGC

MDS280 seq rok1 Prev1

GGC CAA AGG TGG TAA AGG

MDS281 seq rok1 Puni2

TCC TCT TGT CGT CGC ACC

MDS282 seq rok1 Prev2

GCA GGA TGA CCC TGC AG

MDS283 seq rok1 Puni3

CCA CAA ATC AAG CGA TCC

MDS284 seq rok1 Prev3

TCG CGT TTG GCT TTG TGC

MDS285 seq rok1 Puni4

TAC GGC ACA AAG CAG AGG

MDS286 seq rok1 Prev4

ATC ACA TCT CCC GAA CGC

MDS287 seq rok1 Puni5

TGC ACA TGC AAG TTG GCG

MDS288 seq rok1 Prev5

TGT CTC GTC TCG CAA TCG

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *rok1* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

3701-L-uni (T. Brefort, pers. Mitteilung)

CAG CTG GCA CTT TGT CAC TCA CG

3701-L-rev-SfiI (T. Brefort, pers. Mitteilung)GTG GGC CAT CTA GGC CGT GTG TGG
TCG AGA TTT GAC AGC**3701-R-KO-uni-SfiI** (T. Brefort, pers. Mitteilung)CAC GGC CTG AGT GGC CGG ATG CGA
TCA ACA CAT ACA GTG AAG G**3701-KO-R-rev** (T. Brefort, pers. Mitteilung)

GTT GCC AAC TCT GTC GGC TAT CG

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *mhp2* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

MDS292um02303kolb1

GCA GCA TAC ACA TGG AGC GTT GC

MDS293um02303kolb2SfiICAC GGC CTG AGT GGC CCG CCT GTT
ACC ATT GTT GGG ACG**MDS294um02303korb1SfiI**GTG GGC CAT CTA GGC CAC CTA GCA
CCT TAC CTC GAT AGC**MDS295um02303korb2**

GTT GTA GCG CAG AGA GAT CAA GC

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *kpp2* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

MDS258kpp6kolb1

TCA AGT AGA GAC CGC CAG CAA GC

MDS259kpp6kolbSfiICAC GGC CTG AGT GGC CAG ACA TGT
CGC GTT GGA GAG AGG**MDS260kpp6korbSfiI**GTG GGC CAT CTA GGC CTG ATG CTT
CGT CAG CGT CAG TCG**MDS261kpp6korb2**

CTC GTT CCA ACG CAT TCG CAA CC

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (L) und rechten (R) Flanke von *ptp3* zur Konstruktion von K. O.-Konstrukten nach Kämper (2004):

MDS181 10534Ko lb1

ATC ACG GAT TGC ATC ACC TCG CC

MDS182 10534Ko SfiI lb2CAC GGC CTG AGT GGC CAC GAT GTT
GGG TAG ACG ATC ACG**MDS183 10534Ko SfiI rb1**GTG GGC CAT CTA GGC CAG TCT GGA
AAG ATG AGA GGG TGC**MDS184 10534Ko rb2**

TTT GGT AGC TCG TCA TCA GCT CG

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken Flanke für die Konstruktion von *rok1-mCherry*-Fusionskonstrukten mit dem SfiI-Kassetzensystem nach Brachmann *et al.* (2004):

MDS276rok1RFPIb1

CTC ACC GAA GCA ATG AGG CTA GC

MDS277rok1HAlb2SfiIGTG GGC CGC GTT GGC CGA GAG GCT
GTC GCT GTC GCC G

Folgende Oligonukleotide liegen im *uac1*-Locus und dienen zur Amplifikation des *uac1*-Deletionskonstruktes aus p Δ uac1-Nat:

LW-uac1-L1

CGA CGA AAG GTC TGT TTT GGA CG

LW-uac1-R4

TGG TCA AAG AAT TCG CCG AGT GG

Folgende Oligonukleotide liegen im *rok1*-Locus und dienen zur Amplifikation des Inserts des *rok1*-Komplementationskonstruktes:

MDS299 rok1kompl uni

AGA GGC CCG AGT CGT AAT CG

MDS300 rok1kompl rev

CCA CAT TGG GCT CAT GCT GG

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation des *rok1*-ORF und fügen weiter eine *NcoI*-kompatible *BspHI*-Schnittstelle am Start- und eine *NcoI*-Schnittstelle hinter dem Stopcodon ein.

MDS186 um03701 uni *BspHI*

GAG TCT TCA TGA ATT TAC GCA ACG
CTA ACC

MDS187 um03701 rev *NotI*

ATG CGC GGC CGC TAC GAG AGG CTG
TCG CTG TCG

Mit diesen Oligonukleotiden wurden die quantitativen RT-PCR Analysen durchgeführt:

Zur Messung der *ppi*-Transkriptmenge:

rt-*ppi*-f-2 (Scherer *et al.*, 2006)

ACA TCG TCA AGG CTA TCG

rt-*ppi*-r-2 (Scherer *et al.*, 2006)

AAA GAA CAC CGG ACT TGG

Zur Messung der *bE*-Transkriptmenge

bE-F (Scherer *et al.*, 2006)

GCA CAA CAC CTT CCA TTG AC

bE-R (Scherer *et al.*, 2006)

ACT GCT CCC GAA TGT ACT

Zur Messung der *rok1*-Transkriptmenge:

MDS266rok1RTuni

GGA CGC ATT CTT GAA AGG

MDS267rok1RTrev

AAC AGA GCA CGT AGA TGG

Zur Messung der *mkp2*-Transkriptmenge:

MDS301um02303RTuni

TTG TCG CCG AAT TGA TGC

MDS302um02303RTrev

TAG GCG AAT CAA GTC TGG

Zur Bestimmung der relativen pilzlichen DNA Menge in infizierten Pflanzen:

mfa1-RT-FW (M. Vranes, pers. Mitteilung)

GCT TTC GAT CTT CGC TCA GAC

mfa1-RT-RV (M. Vranes, pers. Mitteilung)

CAA CAA CAC AGC TGG AGT AGC

Zur Bestimmung der relativen pilzlichen DNA Menge in infizierten Pflanzen dienten folgende Mais-spezifischen Primer als Kontrolle:

Gapdh-FW (G. Döhlemann, pers. Mitteilung)

CTT CGG CAT TGT TGA GGG TTT G

Gapdh-RV (G. Döhlemann, pers. Mitteilung)

TCC TTG GCT GAG GGT CCG TC

Diese Oligonukleotide wurden in Kombination mit dem GeneRacerKit (Invitrogen) zur Herstellung von stamm-spezifischer cDNA verwendet:

Rok1-3'UTR-RACE

CCT ACT GCT CGA TCC ACC

Rok1-3'UTR-RACE-nested

GTA CGG CTC TGA AAG TGC

Folgende Oligonukleotide wurden zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus verwendet:

OAN74

GAG CAG TTC ATG ATG GTA AG

OAN75

TTC GAG CTG GTT GCC TGC

OAN76

CTA TGC GGC ATC AGA GCA G

OAN77

TTC GCT CTA CCG ATG CCT T

OAN78

TCT CCA AGC CAC GGT TCC

REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG
Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)-SK, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

4.1.3 Stämme

E. coli-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*,

recA1, *lacZ* Δ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR2.1/4-TOPO wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*.

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für alle Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

U. maydis-Stämme

Die Stämme in Tabelle 6 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 7 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. In allen Stämmen wurden einfach homologe Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyse bestätigt.

Tabelle 1: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6b	<i>a1 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	Phleo ^R	Kämper <i>et al.</i> , 2006
FB1 Δ kpp2 (PM1)	<i>a1 b1</i> Δ kpp2	Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB2 Δ kpp2 (PM2)	<i>a2 b2</i> Δ kpp2	Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 1999
SG200 Δ rok1	<i>a1:mfa2 bW2 bE1</i> Δ rok1	Phleo ^R , Hyg ^R	T. Brefort, pers. Mitteilung
SG200 Δ kpp2 (PM4)	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> Δ kpp2	Phleo ^R , Nat ^R	Müller <i>et al.</i> , 1999
SG200kpp6AEF (AB313)	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>kpp6T355A,Y357F</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	Brachmann <i>et al.</i> , 2003
FB1 Δ crk1 (UV1)	<i>a1 b1</i> Δ crk1	Hyg ^R	Garrido <i>et al.</i> , 2004
SG200AM1	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>ip^R::[P_{um01779}:egfp]ip^S</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> , 2008
FB1crg:fuz7DD ^m (FB1UV)	<i>a1 b1 P_{mfa1}::[egfp-Nat^R-P_{crg1}:fuz7DD]mfa1</i>	Nat ^R	Brefort, 2004

Tabelle 2: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
FB1 Δ rok1	<i>a1 b1</i> Δ rok1	Hyg ^R	FB1
FB2 Δ rok1	<i>a2 b2</i> Δ rok1	Hyg ^R	FB2
SG200 Δ kpp2 Δ rok1	<i>a1:mfa2 bW2 bE1</i> Δ kpp2 Δ rok1	Phleo ^R , Nat ^R , Hyg ^R	SG200 Δ kpp2
SG200 Δ kpp2 Δ kpp6	<i>a1:mfa2 bW2 bE1</i> Δ kpp2 Δ kpp6	Phleo ^R , Nat ^R , Cbx ^R	SG200 Δ kpp2
SG200kpp6AEF Δ rok1	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>kpp6T355A,Y357F</i> Δ rok1	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200kpp6AEF

SG200Δkpp2Δkpp6Δrok1	<i>a1:mfa2 bW2 bE1 Δkpp2 Δkpp6 Δrok1</i>	Phleo ^R , Nat ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200Δkpp2Δkpp6
FB1Δkpp2Δrok1	<i>a1 b1 Δkpp2 Δrok1</i>	Nat ^R , Hyg ^R	FB1Δkpp2
FB2Δkpp2Δrok1	<i>a2 b2 Δkpp2 Δrok1</i>	Nat ^R , Hyg ^R	FB2Δkpp2
FB1Δcrk1Δrok1	<i>a1 b1 Δcrk1 Δrok1</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	FB1Δcrk1
FB1rok1 ^{con}	<i>a1 b1 ip^R[P_{otef:rok1}]ip^S</i>	Cbx ^R	FB1
FB1rok1 ^{con2}	<i>a1 b1 ip^R[P_{otef:rok1}]Δip^S</i>	Cbx ^R	FB1
FB2 rok1 ^{con}	<i>aA2 b2 ip^R[P_{otef:rok1}]ip^S</i>	Cbx ^R	FB1
FB2 rok1 ^{con2}	<i>a2 b2 ip^R[P_{otef:rok1}]Δip^S</i>	Cbx ^R	FB2
SG200Drok1pRok1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δrok1 ip^R[P_{rok1:rok1:T_{rok1}}]ip^S</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δrok1
SG200rok1 ^{con}	<i>a1:mfa2 bW2bE1 ip^R[P_{otef:rok1}]ip^S</i>	Phleo ^R , Nat ^R	SG200
FB1crg:fuz7DD ^m rok1 ^{con}	<i>a1 b1 P_{mfa1}:[egfp-Nat^R- P_{crg1:fuz7DD}]mfa1 ip^R[P_{otef:rok1a}]ip^S</i>	Cbx ^R , Nat ^R	FB1crg:fuz7DD ^m
SG200AM1Δrok1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 ip^R:[P_{um01779:egfp}]ip^SΔrok1</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200AM1
FB1kpp2-egfp	<i>a1 b1 kpp2:[egfp-Nat^R]</i>	Nat ^R	FB1
FB1kpp2-egfp rok1- mCherry	<i>a1 b1 kpp2:[egfp-Nat^R] rok1:[mcherry-Hyg^R]</i>	Nat ^R , Hyg ^R	FB1kpp2-egfp
SG200Δmkp2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmkp2</i>	Cbx ^R , Nat ^R	SG200

4.1.4 Ausgangsplasmide

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Klonierungsvektoren

pSP72 (Promega), **pBS(+)****SKII** (Stratagene), **pBS(+)****KSII** (Stratagene), **pTZ18R** (Pharmacia), **pTZ19R** (Pharmacia), **pSL1180** (Pharmacia), **pNEB193** (NEB), **pCR2.1 -/ II- 4-TOPO** (Invitrogen).

Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit *U. maydis*

pBS-hhn (Kämper, 2004)

Dieses pBS(+)**KSII**-Derivat enthält eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment.

pMF1-h (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)**KSII**-Derivat enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,7 kb *SfiI*-Fragment.

pMF1-n (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)**KSII**-Derivat enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1,4 kb *SfiI*-Fragment.

pMF1-c (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses pBS(+)**KSII**-Derivat enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1,9 kb *SfiI*-Fragment.

pSL-Cbx(+), **pSL-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Carboxin-Resistenzkassette als 1,9 kb *NoI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen.

pMF5-1mCherry (D. Lanver, pers. Mitteilung)

Dieses pBS(+)**KSII**-Derivat enthält eine *mCherry*-Kassette als 3,9 kb *SfiI*-Fragment.

p123 (C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

pΔrok1-Hyg (T. Brefort, pers. Mitteilung)

Dieses pCR2.1-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von *rok1*-Deletionsmutanten. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei den *rok1*-ORF flankierende Bereiche mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,1 kb) mit den Oligonukleotiden 3701-L-uni / 3701-L-rev-*Sfi*I und die 3'-Flanke (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden 3701-R-KO-uni-*Sfi*I / 3701-R-KO-rev amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über 3701-L-rev-*Sfi*I bzw. 3701-R-KO-uni-*Sfi*I eingeführten *Sfi*I-Schnittstellen mit der ebenfalls *Sfi*I geschnittenen 1,9 kb-Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCR2.1-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *rok1*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden 3701-L-uni und 3701-R-KO-rev.

pΔuac1-NatR (L. Wang, pers. Mitteilung)

Diese Plasmid dient zur Deletion des offenen Leserahmens von *uac1* und beinhaltet eine Nourseothricin-Resistenzkassette.

Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungssonden

pSP4,2EcoRV (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 4,2 kb *EcoRV*-Fragment aus dem *al*-Locus.

4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte

Plasmide

Hilfsplasmide

pmCherry-Hyg

Dieses pMF5-1-Derivat beinhaltet eine xkb *Sfi*I mCherry-Hygromycin-Resistenzkassette zur Fusion von *mCherry* an das 3'Ende von offenen Leserahmen. Zur Konstruktion wurde das 1,9 kb-

Fragment des *NotI/XmnI* restringierten pMF1-h Plasmids mit *NotI*-linearisierten pMF5-1 ligiert.

rok1-Plasmide

pRok1^{con}

Dieses p123-Derivat dient der homologen Integration von *Potef:rok1* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht die ektopische, konstitutive Expression von *rok1*. In pRok1^{con} wurde das 0,7 kb *NcoI/NotI egfp*-Fragment aus p123 durch ein 3,7 kb *BspHI/NotI* geschnittenes PCR Produkt ersetzt, dass den *rok1*-ORF umfasst. Dieses Produkt wurde mit den Oligonukleotiden MDS186 um03701 uni *BspHI* / MDS187 um03701 rev *NotI* generiert. Die verwendeten Oligonukleotide fügen eine *NcoI*-kompatible *BspHI*-Schnittstelle am Start- und eine *NotI*-Schnittstelle hinter dem Stopcodon des *rok1*-ORF ein. Als Matrize diente genomische DNA des Stammes FB1.

pRok1-mCherry-Hyg

Dieses pCRII-TOPO-Derivat dient zur Expression eines Rok1-mCherry Fusionsprotein im endogenen *rok1*-Locus. Für die Konstruktion wurde der Bereich von bp + 2158 bis + 3207 mit den Oligonukleotiden MDS276rok1RFPIb1 / MDS277rok1HALb2*Sfi*I amplifiziert. Hierdurch wurde hinter dem Stopcodon des *rok1*-ORF eine *Sfi*I Schnittstelle eingefügt. Desweiteren wurde der 3'-flankierende Bereich des *rok1*-ORF mit den Oligonukleotiden 3701 - R-KO -uni-*Sfi*I / 3701-KO-R-rev amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA des Stammes FB1. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über MDS277rok1HALb2*Sfi*I bzw. 3701-R-KO-uni-*Sfi*I eingeführten *Sfi*I-Schnittstellen mit der ebenfalls *Sfi*I geschnittenen 3,7 kb-mCherry-Hygromycin-Resistenzkassette aus pmCerry-Hyg ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCRII-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *rok1*-mCherry-Fusionskonstruktes mit den Oligonukleotiden MDS276rok1RFPIb1 und 3701-R-KO-rev.

pRok1-Kompl

Dieses pSL-Cbx(-)-Derivat beinhaltet den *rok1*-Lokus von bp -1745 bis bp +3432 des *rok1*-ORF und dient zur Komplementation des *rok1*-

Deletionsphänotyps durch Integration in den *ip*-Lokus von *U. maydis*. Zur Konstruktion wurde der den *rok1*-ORF beinhaltende Bereich des *rok1*-Lokus mittels PCR mit den Oligonukleotiden MDS299 rok1kompl uni / MDS300 rok1kompl rev amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA des FB1 Stammes. Nach Restriktion mit *BspHI* wurde dieses Produkt dem *NcoI*-linearisiertem pSL-Cbx(+) Plasmid ligiert.

Weitere Plasmide mit Deletionskonstrukten

pKpp6ko-Cbx

Dieses pCRII-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von *kpp6*-Deletionsmutanten. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei den *kpp6*-ORF flankierende Bereiche mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden MDS258kpp6kolb1 / MDS259kpp6kolbSfiI und die 3'-Flanke (1,1 kb) mit den Oligonukleotiden MDS260kpp6korbSfiI / MDS261kpp6korb2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über MDS259kpp6kolbSfiI bzw. MDS260kpp6korbSfiI eingeführten SfiI-Schnittstellen mit der ebenfalls SfiI geschnittenen 1,9 kb-Carboxin-Resistenzkassette aus pMF1-c ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCRII-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *mkp2*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden MDS292um02303kolb1 und MDS295um02303korb2.

pΔmkp2-Hyg

Dieses pCRII-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von *mkp2*-Deletionsmutanten. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei den *mkp2*-ORF flankierende Bereiche mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,1 kb) mit den Oligonukleotiden MDS292um02303kolb1 / MDS293um02303kolb2SfiI und die 3'-Flanke

(1,0 kb) mit den Oligonukleotiden MDS294um02303korb1SfiI / MDS295um02303korb2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über MDS293um02303kolb2SfiI bzw. MDS294um02303korb1SfiI eingeführten SfiI-Schnittstellen mit der ebenfalls SfiI geschnittenen 1,9 kb-Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCRII-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *mkp2*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden MDS292um02303kolb1 und MDS295um02303korb2.

pΔptp3-Hyg

Dieses pCRII-TOPO-Derivat dient der Erzeugung von *ptp3*-Deletionsmutanten. Für die Konstruktion wurden zunächst zwei den *ptp3*-ORF flankierende Bereiche mittels PCR amplifiziert. Mit genomischer DNA des Stammes FB1 als Matrize wurde die 5'-Flanke (1,0 kb) mit den Oligonukleotiden MDS181 10534Ko lb1 / MDS182 10534Ko SfiI lb2 und die 3'-Flanke (1,1 kb) mit den Oligonukleotiden MDS183 10534Ko SfiI rb1 / MDS184 10534Ko rb2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach der Restriktion der über MDS182 10534Ko SfiI lb2 bzw. MDS183 10534Ko SfiI rb1 eingeführten SfiI-Schnittstellen mit der ebenfalls SfiI geschnittenen 1,4kb-Nourseothricin-Resistenzkassette aus pMF1-n ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCRII-TOPO inseriert und diente als Matrize zur PCR-Amplifikation des *ptp3*-Deletionskonstruktes mit den Oligonukleotiden MDS181 10534Ko lb1 und MDS184 10534Ko rb2.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung Transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und

15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-resistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin

mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor

weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa $1\text{--}5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde 50 ml frischem YEPS-Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1\text{--}2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 20 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 20 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit ca. 5 µg maximal aber 10 µl linearisierter Plasmid-DNA oder PCR-Produkt und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1 µg

zirkulärer Plasmid-DNA und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 8 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden im Allgemeinen insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
sterilfiltriert

STC

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
sterilfiltriert

STC/PEG

10 g PEG4000 in 15 ml STC

Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden von Platte in CM-Glucose Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 5 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H₂O_{bid.} so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD₆₀₀ = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurden gleiche Volumina der jeweiligen

Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 - 48 h bei 28°C unter Luftabschluss inkubiert.

Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden im CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 15 ml PPN Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 1 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium, dem zuvor kompatibles a2-Pheromon (Bachem, Basel) in DMSO in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml oder nur DMSO zugesetzt worden war, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in den PPN-Röhrchen auf einem Roll-Inkubator (New Brunswick Scientific) bei ca. 20 Upm in nahezu waagrecht Position gedreht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bildung von Konjugationshyphen mikroskopisch analysiert.

Induktion von Appressorienbildung auf Parafilm M

Die zu testenden Stämme, SG200AM1 und dessen Derivate, wurden im YEPSL bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ geschüttelt, pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und in 2% YEPSL aufgenommen, sodass die $OD_{600} = 0,1$ betrug. Es wurde 10 µM 16-Hydroxyhexadecansäure oder die entsprechende Menge an Ethanol hinzugefügt. Diese Suspension wurde dann mittels eines Evaporators (EcoSpray Labo Chimie, France) auf mit Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) überzogene Objektträger so aufgesprüht, dass sich Tröpfchen von ca. 1 µl Volumen bildeten. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 18 Stunden in einer mit Parafilm M versiegelten Petrischale, die ein angefeuchtetes Papiertuch enthielt. Die Bestimmung des Anteils an Appressorien-bildenden Zellen erfolgte mikroskopisch. Hierzu wurde die Anzahl der Zellen, die eGFP-Fluoreszenz zeigten in Relation

mit der Gesamtzahl an filamentierenden Zellen gesetzt.

Induktion des *crg1*-Promotors

Die Stämme wurden aus Vorkultur in CM-Flüssigmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um reprimierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu $OD_{600} \approx 0,6$ bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen $H_2O_{bid.}$ resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in CM-Flüssigmedium resuspendiert, das Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um den *crg1*-Promotor zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt.

Test auf Pathogenität

Der verwendete Pathogenitätstests ist eine Spritz-infektion, bei der 200 - 250 µl einer Pilzsuspension (in Wasser, $OD_{600} = 1$) in das Innere des Blattwirtels von 7 Tage alten Maispflanzen der Sorte Golden Early Bantam gespritzt werden. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS-Flüssigkultur auf eine $OD_{600} = 0,8$ angezogen. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet und in Wasser zu einer $OD_{600} = 1$ aufgenommen. Bei Mischungen wurden die entsprechenden Suspensionen entsprechender Stämme vorher 1:1 gemischt. Bei der Bewertung der Symptome, wurden diese 12 Tage nach erfolgter Infektion, wurden sieben Kategorien unterschieden (Kämper *et al.*, 2006). (1) Chlorose; (2) Schwellung der Ligula; (3) Kleine Tumore (≤ 1 mm); (4) Tumore; (5) Schwere Tumore; (6) Verkrüppelte Pflanze; (7) tote Pflanze. Etwa 21 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %-igen CuSO_4 -Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS_L-Platten ausplattiert. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt.

Test auf filamentöses Wachstum und GFP-Fluoreszenz auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze, der Ausbildung von Infektionsstrukturen und der Expression des *P_{um01779:egfp}*-Reporters wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 18 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, geerntet. Die geernteten Blattstücke wurden 1 min in eine Calcofluor-Färbelösung (2 µg/ml Fluorescent Brightener 28, Sigma) gefärbt. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht (DAPI bzw. GFP-Filter) im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht. Zur mikroskopischen Beobachtung von *U. maydis*-Zellen während des biotrophen Wachstums wurden 0,5 cm² große Quadrate aus Maisblättern 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion unweit der Infektionsstelle entnommen.

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski- oder DIC-Optik und Fluoreszenz-Mikroskopie. 8 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft, mit 8 µl einer 2 % wässrigen Lösung von Low-Melting-Agarose (37°C; Sigma) vermischt, und mit einem Deckgläschen bedeckt. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm;

GFP 450-490 nm und 515-565 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalibrierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) ausführlich beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 bzw. 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C resuspendiert bei -20°C

aufbewahrt. Mit dieser Methode gelang es routine-mäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM Na₂-EDTA
8 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton X-100

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS_L-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen und bei 55°C resuspendiert.

Ustilago-Lysispuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1 % (w/v) SDS

TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

DNA-Isolierung aus infizierten Maispflanzen

Zur Bestimmung der relativen pilzlichen Biomasse in infizierten Maispflanzen, wurde DNA aus Blattabschnitten des 3. Folgeblattes extrahiert. Diese Methode ist modifiziert nach

Hoffman und Winston (1987). Hierzu wurden Abschnitte, die 3 cm unterhalb der Einsichtsstelle am 3. Folgeblatt umfassten, geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert. Es wurden je 10 Blattabschnitte als sogenannte Pools vereint. Es wurden 3 unabhängige Pools untersucht. Die Pools aus Blattstücken wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend zusammen mit 0,3 g Glasperlen in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 μl Ustilago-Lysispuffer und 400 μl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 μl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 μl TE mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A aufgenommen und bei 55°C resuspendiert. Und der DNA-Gehalt mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt.

RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.* (1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis $\text{OD}_{600} \approx 0,5$ bei 29°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 μl AE-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 μl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C , Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 μl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 μl) wurde danach mit 40 μl 3 M Na-

Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C , Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 – 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 μl auf einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer

50 mM Na-Acetat, pH 5,3

10 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

AE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA wird in dieser Methode durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Die RNA-Probe (normalerweise 15 μg) wurde dazu in 16 μl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 μl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 % MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde nach 1 h im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

MOPS-Puffer

200 mM MOPS, pH 7,0

80 mM Na-Acetat

10 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

RNA-Auftragspuffer

50 % (w/v) Saccharose

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF
in MOPS-Puffer

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h. **DENAT-Lösung**

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH

Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC 2 – 4 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert. **20x SSC**

300 mM Na-Citrat, pH 7,0
3 M NaCl

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N⁺-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C

präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0
50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5 % (w/v) SDS

Waschpuffer

1x SSC
0,1 % (w/v) SDS

Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (New England Biolabs) unter Verwendung von [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Bei über PCR-Amplifikation hergestellten DNA-Fragmenten diente DNA des *U. maydis* Stammes FB1 als Matrize. Folgende DNA-Fragmente wurden eingesetzt:
mfa1 ein 0,7 kb *EcoRV*-Fragment
aus pSP4,2*EcoRV*

4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

Sequenzierung von DNA

DNA wurde vor der automatischen Sequenzierung mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt und anschließend mit einem ABI377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert oder zur externen Sequenzierung an die Abteilung „ADIS“ des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln verschickt.

Die Sequenzreaktion mit ABI377 wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na₂-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet. Die Sequenz-Rohdaten wurden zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert. Rohdaten extern sequenzierter DNA wurden mit dem Programm SEQUENCHER (Gene Codes Corporation) auf einem Apple Macintosh ausgewertet.

Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

VectorNTI 9.0 (Invitrogen) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen.

BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Daten-banken.

SMART (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

PSORT2 (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

SIGNALP (Nielsen *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.

PESTFIND (Rechsteiner und Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein

ISREC, **INTERPROSCAN** und **DART** zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Suche nach Motiven ähnlicher Proteine.

http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rpszur>

CLUSTALW (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

4.3.4 PCR-Techniken

Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl mit Hot-Start durchgeführt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94°C/4 min - 1U Taq -94°C/1 min - [94°C/1 min - 65°C/1 min - 72°C/1 min]x 30 - 72°C/5 min

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis* Zellen

Diese Technik ist ausführlich in Brachmann (2001) beschrieben und ermöglicht eine Vorauswahl richtiger Transformanten. In dieser Methode werden Zellen der Transformanten durch 10 min initialer Denaturierungszeit zum Platzen gebracht und so genomische DNA freigesetzt, die nun als Matritze für die PCR dient. Diese PCR-Analysen werden so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen homologen Rekombination kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Anschließend werden die Kandidaten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden in dieser Arbeit folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

ip-Locus: OAN74/OAN75
OAN74/OAN76
OAN77/OAN78

Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden die *rok1*-Transkripte aus FB1 vor und nach Pheromon-Induktion mittels 3'-RACE bestimmt (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde das GeneRACER Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Gesamt-RNA wurde zunächst über RNeasy-Säulen (QIAGEN) aufgereinigt und DNaseI behandelt um DNA-Kontaminationen auszuschließen. Für die RACE-Experimente wurden dann jeweils 4 µg gereinigte RNA eingesetzt.

Zunächst 3'-RACE wurde die mRNA mit dem 3'-Oligonukleotid-1 (Kit) revers transkribiert. Dieses Oligonukleotid weist an seinem 3'-Ende eine oligo(dT)-Sequenz und an seinem 5'-Ende eine spezifische Nukleotidfolge auf, so dass die generierten oligo(dT)-cDNA-Moleküle mit dem internen 3'-Oligonukleotid-2 (Kit) und dem *rok1*-spezifischen Oligonukleotid Rok1-3'UTR-RACE-nested amplifiziert werden konnten.

Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, isoliert und in pCR4-TOPO kloniert und sequenziert.

DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit der Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um eventuell noch vorhandene DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Einzelheiten siehe Herstellerprotokoll TURBO DNA-free™-Kit).

Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix-Kit von der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus Pilzkulturen extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNASynthese bei 50°C für 50 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem H2O 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert. Für Gesamt-RNA, die aus Pflanzmaterial von der Pflanzenoberfläche isoliert wurde, wurden 10-50 ng Gesamt-RNA eingesetzt und bei 50°C für 50 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde unverdünnt eingesetzt.

Real-Time-PCR

Real-time PCR wurden mit Hilfe des Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG-Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 1 µg der synthetisierten cDNA, bzw. 0,5 µg extrahierter DNA eingesetzt (s.o.). Als Referenzfarbstoff wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (1 µl einer 1 µM Stammlösung/50 µl-Reaktionsansatz) der Firma Biorad eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms: 95°C für 2 min, 45 Zyklen für 15 s bei 95°C, 15 s bei 55°C und 30 s bei 72°C. Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am Bio-Rad-iCycler-System überprüft. Für die Bestimmung der *rok1*-Transkriptmenge wurden die Primer MDS266rok1RTuni /

MDS267rok1RTrev verwendet. Die mkp2-Transkriptmenge wurde unter Verwendung der Primer MDS301um02303RTuni / MDS302um02303RTrev bestimmt. Als Referenz in der rok1-, bzw. mkp2-Expressionsanalyse diente die mit den Primern rt-ppi-f-2 / rt-ppi-r-2 bestimmte Transkriptmenge an ppi. Zur Bestimmung der relativen pilzlichen Biomasse in infiziertem Pflanzengewebe wurde die mittels den Primern mfa1-RT-FW / mfa1-RT-RV ermittelte Pilz-DNA-Menge mit der durch die Primer Gapdh-FW / Gapdh-RV bestimmten Pflanzen-DNA Menge in Relation gesetzt. Die Quantifizierung erfolgt mittels der Bestimmung der Ct-Werte(Threshold Cycle). Zur Kalkulation des Ct-Wertes, der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressions-, bzw. „Biomasse“-werte erfolgte mit dem Program BioRad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt bei 25 mA für 1 h aufgetrennt. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

SDS-PAGE-Probenpuffer (6x)

- 300 mM Tris-Cl, pH 8,0
- 30 % (v/v) Glycerin
- 20 % (w/v) SDS
- 0,5 g/l Bromphenolblau
- 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Proteingel-Laufpuffer

- 25 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 200 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

Sammelgel

- 125 mM Tris-Cl, pH 6,8
- 5 % (w/v) Acrylamid
- 0,13 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

Trenngel

- 375 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 10 % bzw. 15 % (w/v) Acrylamid
- 0,27 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

Coomassie-Färbelösung

- 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

4.4.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit H_2O_{bid} gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der

Spannung (1 h, 1 mA/cm²) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Anodenpuffer 1

300 mM Tris-Cl, pH 10,4
15 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer 2

30 mM Tris-Cl, pH 10,4
15 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Tris-Cl, pH 9,4
40 mM ϵ -Aminocapronsäure
15 % (v/v) Methanol

4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5 % Magermilch-pulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 - 12 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST 1 % Magermilch-pulver, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 1 - 12 h mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde

die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als primärer Antikörper wurde phospho-spezifische polyklonaler Rabbit-anti-p44/42 MAPK (in einer Verdünnung von 1:10.000, [Cell Signaling Technology]), bzw. Rabbit-anti-Kpp2 (Müller *et al.*, 2003) verwendet. Als sekundärer Antikörper diente der HRP-gekoppelte Anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology in einer Verdünnung von 1:20.000). Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

TBST

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20

ECL I

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,44 % (v/v) p-Coumarinsäure in DMSO
1 % (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO

ECL II

100 mM Tris-Cl, pH 8,0
0,018 % (v/v) H₂O₂

5 Literaturverzeichnis

- Andersson, J., Simpson, D. M., Qi, M., Wang, Y. und Elion, E.A. (2004) Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *Embo J.* **23**:2564-2576.
- Andrews, D. L., Egan, J. D., Mayorga, M. E. und Gold, S.E. (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Molecular Plant Microbe Interaction* **13**:781-786.
- Alessi, D. R., Smythe, C. und Keyse, S. M. (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* **8**(7):2015-2020.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**:403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Ausubel, M.A., Ausubel, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., and Smith, J.A. (1987). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1994a) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev.* **8**:1367-1378.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1994b) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**:247-266.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* **37**:149-170
- Basse, C. und Steinberg, G. (2005) *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol.* **5**(2004):83–92.
- Biswas, S., van Dijck, P. und Datta, A. (2007) Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**:348-376.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmle, C. und Kahmann, R. (1995) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. of Botany* **73**, 320-325.

- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R.** (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**:441-450.
- Brachmann, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**:216-226.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P. und Kahmann, R.** (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *Embo J* **22**:2199-2210.
- Brefort, T.** (2004) Identifizierung von Effektoren der Pheromon-MAPK-Kaskade in *Ustilago maydis*. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Philipps-Universität Marburg.
- Brefort, T., Müller P. und Kahmann, R.** (2005) The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of *prf1* in *Ustilago maydis*. *Eucaryot Cell*, **4**(2):379-391.
- Brondello, J. M., Pouysségur, J. und McKenzie, F. R.** (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* **286**(5449):2514-2517
- Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H. und Pantaloni, D.** (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**:1307–1322.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S. und Liu, H.** (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **46**(5):1335-44.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J.S. und Pelech, S.L.** (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem.* **266**:15180-15184
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**:2110-2114.
- Csank, C., Makris, C., Meloche, S., Schröppel, K., Röllinghoff, M., Dignard, D. et al.,** (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* **8**:2539-2551.
- Denu, J., Stuckey J., Saper, M. und Dixon, J.** (1996) Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**:361 - 364.
- Denu, J. M. und Dixon, J. E.** (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* **2**(5):633-641.

- Di Stasio, M., Brefort, T., Mendoza-Mendoza, A., Münch, K. und Kahmann, R.** (2009) The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **73**:73-88.
- Didmon, M., Davis, K., Watson, P., Ladds, G., Broad, P. und Davey, J.** (2002) Identifying regulators of pheromone signalling in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* **41**:241-53.
- Doi, K., Gartner, A., Ammerer, G., Errede, B., Shinkawa, H., Sugimoto, K. und Matsumoto, K.** (1994) *MSG5*, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *Embo J* **13**:61-70.
- Doehlemann, D., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, J. und Kahmann, R.** (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLOS Pathogens* **5**(2): e1000290.
- Douglas, S.E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol.* **3**:37-45.
- Dürrenberger, F., Wong K. und Kronstad, J. W.** (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(10):5684-5689.
- Ebisuya, M., Kondoh, K. und Nishida E.** (2005) The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci.* **118**(14):2997-3002.
- Eddy, S.R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* **3**:114-120.
- Eichhorn, H.** (2004). Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in *Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen. Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Esch, R. K. und Errede, B.** (2002) Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:9160–9165.
- Esch, R. K., Wang, Y. und Errede, B.** (2006) Pheromone-Induced Degradation of Ste12 Contributes to Signal Attenuation and the Specificity of Developmental Fate. *Eukaryot Cell* **5**(12):2147-2160.
- Flández, M., Cosano, I.C. Nombela, C., Martín, H. und Molina, M.** (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem.* **279**:11027-11034.
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J. und Pérez-Martín, J.** (2006) Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**:2369-2387.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Euk Cell.* **2**:494-500.
- Garrido, E. und Pérez-Martín, J.** (2003) The *crk1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **47**:729-743.

- Garrido, E., Voß, U., Müller, P., Castillo-Lluya, S., Kahmann, R. und Pérez-Martin, J.** (2004) The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. *Genes Dev* **18**:3117-3130
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**:647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J.** (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**:2805-2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. und Kronstad, J.W.** (1997) The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**:1585-1594.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. and Hames, B.D. (eds.). DNA cloning, a practical approach, *IRL Press*, Vol.1, pp. 109-135.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Embo J* **15**:1632-1641.
- Hartmann, H. A., Krüger, J., Lottspeich, F. und Kahmann, R.** (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* **11**:1293-1306.
- Heath, I. B.** (1995) The cytoskeleton. In The Growing Fungus, N.A.R. Gow and G.M. Gadd, eds (*London: Chapman & Hall*), 99–134.
- Heringa, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem.* **23**:341-364.
- Hoffman, C. S. und Winston, F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272.
- Holliday, R.** (1974) *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*. Vol. 1. King, R.C. (ed.) New York, USA: *Plenum Press*, 575-595.
- Hull, C. M. und Johnson, A. D.** (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**(5431):1271-1275.
- Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D.** (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**(5477):307-310.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, USA: Academic Press.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J. und Kornfeld, K.** (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**:163-175.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., und Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers
- Kämper, J.** (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**:103-110.

- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**:73-83.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J. et al.,** (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**:97-101.
- Klose, J., de Sá, M. M. und Kronstad, J. W.** (2004) Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **52**:823-835.
- Koppitz, M., Spellig, T., Kahmann, R. und Kessler, H.** (1996) Lipoconjugates: structure-activity studies for pheromone analogues of *Ustilago maydis* with varied lipophilicity. *Int J Pept Protein Res* **48**: 377-390.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. und Kahmann, R.** (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**: 193-198.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. und Levin, D. E.** (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* **13**(5):3067-75
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **40**: 719-730.
- Madhani, H. D. und Fink, G. R.** (1998) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317
- Maeder, C. I., Hink, M. A., Kinkhabwala, A., Mayr, R., Bastiaens, P. I. und Knop, M.** (2007) Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nature Cell Biol.* **9**(11):1319-1326.
- Magee, B. B., Legrand, M., Alarco, A. M. , Raymond, M. und Magee, P. T.** (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **46**(5):1345-51.
- Magee, B. B. und Magee, P. T.** (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* **289**(5477):310-313.
- Marshall, C.J.** (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-185.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J. M., Ruiz C., Nombela C. und Molina M.** (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**:1511-1519.
- Martínez-Espinoza, A. D., Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. G. und Gold, S. E.** (2004) MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol.* **49**:274-281.
- Mata, J. und Bähler, J.** (2006) Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(42):15517-15522

- Mayerhofer, D.** (1938) Weiterer Bericht über kindliche Maisbrandvergiftungen (Ustilaginismus) *Zeitschrift für Kinderheilkunde* **59**:543-552
- Mayorga, M. E. und Gold, S. E.** (2001) A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol.* **34**:485-497.
- Mayorga, M. E. und Gold, S. E.** (2001). The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol* **41**:1365-1379.
- Mendoza-Mendoza, A., Patrick, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vraneš, M., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2009a) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* (in press).
- Mendoza-Mendoza, A., Eskova, A., Weise, C., Czajkowski, R. und Kahmann R.** (2009b) Hap2 regulates the pheromone response transcription factor *prf1* in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **72**(3):683-698.
- Millar, J. B., Buck, V. und Wilkinson, M. G.** (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* **9**(17):2117-2130.
- Moon, A. und Drubin, D. G.** (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell.* **6**:1423–1431.
- Morgan, T. E., Lockerbie, R. O., Minamide, L. S., Browning, M. D. und Bamburg, J. R.** (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin-depolymerizing factor. *J Cell Biol.* **122**:623-633.
- Müller, P.** (2003) Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Philipps-Universität Marburg
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (1999) The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**:1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J.D., Loubradou, G. und Kahmann, R.** (2003a) Guanyl Nucleotide Exchange Factor Sql2 and Ras2 Regulate Filamentous Growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **2**:609-617
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2003b) Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryotic Cell* **2**:1187-1199.
- Murphy L. O. und Blenis, J.** (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* **31**(5):268-275.
- Nakai, K., and Kanehisa, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**:897-911.
- Nakai, K., and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* **24**:34-36.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997a). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst.* **8**:581-599.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997b). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**:1-6.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. und Uemura, T. (2002) Control of Actin Reorganization by Slingshot, a Family of Phosphatases that Dephosphorylate ADF/Cofilin. *Cell* **108**:233-246.
- O'Dowd, M. J. (2001) The History of Medications for Women. *Taylor & Francis*. ISBN 1-85070-002-8:410.
- Pavlov, D., Muhlrade, A., Cooper, J., Wear, M. und Reisler, E. (2007) Actin filament severing by cofilin. *J Mol Biol.* **365**(5):1350–1358.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, B. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. und Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* **22**:153-183.
- Pouyssegur, J. und Lenormand, P. (2003) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem.* **270**:3291–3299.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* **21**:267-271.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. und Kahmann, R. (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J.* **16**:1934-1942.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. und Friend, S. H. (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**(5454):873-80
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**:364-368.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Saxena, M. und Mustelin, T. (2000) Extracellular signals and scores of phosphatases: All roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* **12**:387-96.
- Schauwecker, F., Wanner, G. und Kahmann, R. (1995) Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**:617-625.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. und Kämper, J. (2006) The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**:2388-2401.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**:3091-3092.

- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P.** (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(11):5857-64.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P., and Bork, P.** (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**:295-306.
- Snetselaar, K.M.** (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Experimental Mycology* **17**:345-355.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**:193-203.
- Snetelaar, K.M. und Mims, C.W.** (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**:843.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**:347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**:299-312.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und Kahmann, R.** (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo J* **13**:1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R.** (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**:503-509.
- Straube, A., Enard, W., Berner, A., Wedlich-Soeldner, R., Kahmann, R. und Steinberg, G.** (2001) A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *Embo J* **20**:5091-5100.
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio. S. O. und Kuno, T.** (2003) Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature.* **424**:961-965.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* **24**:1596 1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876 4882.
- Torres, L., Martín, H., García-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. und Nombela, C.** (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutant. *Mol Microbiol.* **5**(11):2845-2854.

- Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. und Mizuno, K.** (2001a). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. **12**:1131–1145.
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R. und Mizuno, K.** (2001b). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol Chem*. **276**:31449–31458.
- Toshima, J.Y., Toshima, J., Watanabe, T. und Mizuno, K.** (2001c). Binding of 14-3-3beta regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J Biol Chem*. **276**:43471–43481.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*. **8**:3703-3709.
- Urban, M., Kahmann, R., and Bölker, M.** (1996a) Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**:31-37.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996b) The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet*. **250**:414-420.
- Vranes, M.** (2006) Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Philipps-Universität Marburg
- Wang, Y. und Dohlman, H. G.** (2002) Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *J Biol Chem*. **277**(18):15766–15772.
- Wang, Y., Ge, Q., Houston, D., Thorner, J., Errede, B. und Dohlman, H. G.** (2003) Regulation of Ste7 ubiquitination by Ste11 phosphorylation and the SCF (Skp1/Cullin/F-box) complex. *J Biol Chem*. **278**(25): 22284-22289
- Weber, I., Gruber, C. und Steinberg, G.** (2003) A Class-V Myosin Required for Mating, Hyphal Growth, and Pathogenicity in the Dimorphic Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. **15**:2826–2842
- Wedlich-Soeldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. und Steinberg, G.** (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Embo J* **19**:1974-1986.
- Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R. und Feldbrügge, M.** (2008) Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**:1041-1053.
- Zhan, X.L., Deschenes, R.J. und Guan, K. L.** (1997) Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. **11**:1690-1702.

DANKSAGUNG

Zum Abschluss möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, sei es wissenschaftlich oder persönlich.

Zunächst sei Regine Kahmann herzlichst gedankt, nicht nur für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit, sondern auch die aufmunternden Worte während nicht so einfachen Zeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Uwe Maier, für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu verfassen und – vor allem – für die schönen Diskussionen und Anregenden Gespräche im Zuge des Graduiertenkollegs 1216 „Intra- and Intercellular Transport and Communication“.

Renate Renkawitz-Pohl und Michael Feldbrügge für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Dem Graduiertenkolleg 1216 der DFG gilt der Dank für die Unterstützung meiner Arbeit und für die Plattform zum wissenschaftlichen Austausch, die es mir bot.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle, sowohl für die wissenschaftliche als auch die sehr persönliche Begleitung während der letzten 5 Jahre, Thomas. Ohne Dich wäre ich nicht das, was ich heute bin, weder wissenschaftlich noch persönlich!

Kathi, Julian und Michael für das stete Interesse an meinen Projekten und für die vielen anregenden Anstöße und Hilfestellungen bei experimentellen Problemen.

Carina, Evelyn, Janine (inkl. Maya), Kai, Miro, Ramon, Saskia und Volker für die Freundschaft über all die Jahre am Institut und für die offenen Ohren!

Karin und Nicole sei mehrfach gedankt: 1. dafür, dass Ihr mich zunächst ertragen habt und 2. für den regen „Austausch“ in der Kaffecke, besonders während der letzten 2 Jahre und 3. dafür, dass Ihr das Labor am Laufen gehalten habt, trotz aller widriger „Umstände“. Ohne Euch würde es im Chaos versinken!

Catharina, Nina, Holger und Lars, für die spannende und produktive Zusammenarbeit im Zuge der Organisation des IITC-Meetings.

Nina und Catharina bin ich auch für die enge Freundschaft außerhalb des GraKos dankbar. Ich habe die Zeit mit Euch sehr genossen und empfand sie als sehr aufbauend!

Thomas, Ramon und Catharina möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit danken

Für die herrliche, gemeinsame Zeit, gerade während den ersten Semestern meines Studiums, danke ich meinen Consemestern Eelko, „Wachse“ und meinem Leibbursch Martin, sowie meinem gesamten Bund für die schöne Zeit in Marburg.

Katrin und Eelko gebührt der Dank dafür, dass sie meinen Telefonterror ertragen und dafür, dass ich immer mit Euch reden und vor allem feiern konnte!

Zum Schluss, aber umso herzlicher, möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken. Für Alles! Hier eine Aufzählung all der Dinge, für die Euch dankbar bin, anzuführen würde den Rahmen sprengen. Deshalb einfach: DANKE!

LEBENS LAUF

Personalien

Maurizio Di Stasio

geboren am 20. September 1979 in Dierdorf

Schulbildung

1986-1990

Besuch der Grund-und Hauptschule Dierdorf

1990-1999

Besuch des Martin-Butzer-Gymnasiums

Dierdorf

Juni 1999

Abitur

Studium

Okt. 1999-Sept. 2005

Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg, Hauptfächer: Genetik, Mikrobiologie, Virologie und Biochemie

Nov. 2004-Sept. 2005

Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie;

Betreuerin: Prof. Dr. Regine Kahmann

Thema: "Identifizierung von Komponenten der morphologischen Pheromonantwort in

Ustilago maydis"

Sept. 2005

Abschluss: Diplom in Biologie

Promotion

Okt. 2005-Jan. 2009

Arbeiten zur Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg:

Betreuerin: Prof. Dr. Regine Kahmann

Thema: „Regulation des Kpp2/Kpp6-MAPK Moduls in *Ustilago maydis* durch

Phosphatasen“

Beruf

Feb. 2009

Patentsachbearbeiter bei Vossius und Partner, Büro Berlin